

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR I**



**TESIS DOCTORAL**

**Interacciones de proteína-péptido: estudio de  
DYLLT1 y del dominio PDZ de la Óxido Nítrico  
Sintasa neuronal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Javier Merino Gracia**

DIRECTOR

**José Ignacio Rodríguez Crespo**

**Madrid, 2017**





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



Interacciones proteína-péptido:  
Estudio de DYNLT1 y del dominio PDZ  
de la Óxido Nítrico Sintasa neuronal

Trabajo de investigación que presenta

**Javier Merino Gracia**

para la obtención del Grado de Doctor

Director:

**Dr. J. Ignacio Rodríguez Crespo**

Madrid

2015

# Índice general

<b>Abreviaturas</b>	<b>XIII</b>
<b>Resumen</b>	<b>XVII</b>
<b>Summary</b>	<b>XXI</b>
 <b>I Introducción</b>	 <b>1</b>
<b>1. Óxido Nítrico Sintetasas</b>	<b>3</b>
1.1. Las óxido nítrico sintetasas . . . . .	5
1.1.1. Estructura general . . . . .	5
1.2. La familia NOS . . . . .	7
1.2.1. La nNOS . . . . .	7
1.2.2. La eNOS . . . . .	9
1.2.3. La iNOS . . . . .	10
1.3. El óxido nítrico . . . . .	11
1.3.1. Síntesis del óxido nítrico . . . . .	12
 <b>2. Los dominios PDZ</b>	 <b>13</b>
2.1. Estructura típica . . . . .	15
2.1.1. PSD-95 y la densidad post-sináptica . . . . .	16
2.1.2. La distrofina y la unión neuromuscular . . . . .	17
2.2. El dominio PDZ de la nNOS . . . . .	18
 <b>3. Las Dineínas</b>	 <b>23</b>
3.1. Dineínas vs otros motores . . . . .	25
3.2. Las Dineínas: Aspectos generales . . . . .	25
3.3. Las dineínas del axonema . . . . .	28
3.3.1. Los cilios y el axonema . . . . .	28
3.4. Las dineínas citoplasmáticas . . . . .	29
3.5. La cadena pesada . . . . .	30

3.6.	Las cadenas intermedias . . . . .	30
3.6.1.	El dominio Nt . . . . .	32
3.6.2.	El dominio C-terminal . . . . .	34
3.7.	Las cadenas intermedias ligeras . . . . .	34
<b>4.</b>	<b>Las Cadenas Ligeras</b>	<b>35</b>
4.1.	La Familia DYNLL . . . . .	37
4.1.1.	Estructura de DYNLL . . . . .	38
4.1.2.	Unión de los ligandos a DYNLL1 y la dinámica conformacional . . . . .	40
4.1.3.	Funciones de DYNLL1 . . . . .	42
4.2.	La Familia DYNLRB . . . . .	43
4.3.	La Familia DYNLT . . . . .	44
4.3.1.	Estructura y dimerización . . . . .	46
4.3.2.	Interacciones de DYNLT . . . . .	48
4.3.3.	Funciones de DYNLT . . . . .	51
4.4.	Proteínas que interaccionan con DYNLT1 . . . . .	56
<b>II</b>	<b>Resultados</b>	<b>63</b>
<b>5.</b>	<b>Interacción de péptidos Ct con el dominio PDZ de la nNOS</b>	<b>65</b>
5.1.	Expresión recombinante del dominio PDZ de la nNOS . . . . .	67
5.2.	Interacción del dominio PDZ de la nNOS con péptidos C-terminales . . . . .	68
5.3.	Interacción del dominio PDZ de la nNOS con NOS1AP . . . . .	72
5.4.	Análisis estructural del dominio PDZ de la nNOS por RMN . . . . .	75
5.4.1.	Identificación de residuos implicados en el reconocimiento de la posición –2 . . . . .	78
5.4.2.	Identificación de residuos implicados en el reconocimiento de la posición –3 . . . . .	79
5.4.3.	Los determinantes en el dominio PDZ de la nNOS . . . . .	81
5.5.	Análisis de la interacción de otras secuencias C-terminales . . . . .	82
5.5.1.	Una secuencia de tipo I . . . . .	82
5.5.2.	El resto de proteínas . . . . .	84
5.5.3.	Las claudinas . . . . .	86
<b>6.</b>	<b>La interacción de DYNLT1 con las GTPasas RagA y Rab3D</b>	<b>89</b>
6.1.	Identificación de la región de interacción entre RagA y DYNLT1 . . . . .	91
6.2.	Caracterización de la interacción <i>in vivo</i> . . . . .	95
6.3.	Asociación simultánea de DYNLT1, RagA y DIC . . . . .	98
6.4.	Caracterización estructural de la interacción . . . . .	101
6.5.	Interacción de DYNLT1 con otras GTPasas . . . . .	104

<b>III</b>	<b>Discusión</b>	<b>107</b>
<b>7.</b>	<b>El dominio PDZ de la nNOS y la unión a péptidos Ct</b>	<b>109</b>
7.1.	Conclusiones . . . . .	122
<b>8.</b>	<b>DYNLT1 y las GTPasas</b>	<b>125</b>
8.1.	Conclusiones . . . . .	131
<b>IV</b>	<b>Metodología experimental</b>	<b>133</b>
<b>9.</b>	<b>Materiales</b>	<b>135</b>
9.1.	Reactivos generales . . . . .	135
9.2.	Células y cepas . . . . .	135
9.3.	Medios de Cultivo . . . . .	136
9.4.	Tampones y soluciones de stock . . . . .	137
9.4.1.	Soluciones de stock . . . . .	137
9.5.	Anticuerpos . . . . .	138
9.6.	Plásmidos . . . . .	138
9.6.1.	Plásmidos para expresión recombinante . . . . .	139
9.6.2.	Plásmidos para expresión celular . . . . .	139
9.6.3.	Plásmidos para dobles híbridos de levaduras . . . . .	140
9.7.	Péptidos sintéticos . . . . .	140
<b>10.</b>	<b>Métodos</b>	<b>143</b>
10.1.	Genética molecular . . . . .	143
10.1.1.	Diseño del pEGFPmod . . . . .	143
10.1.2.	Clonación de fragmentos cortos de las proteínas . . . . .	144
10.1.3.	Construcciones de DYNLT1 . . . . .	144
10.1.4.	Diseño de la forma autosaturada de DYNLT1 . . . . .	145
10.1.5.	Clonación de la cadena intermedia . . . . .	146
10.1.6.	Clonación de las GTPasas pequeñas moleculares . . . . .	147
10.1.7.	Clonación de la nNOS y el dominio PDZ . . . . .	148
10.2.	Cultivos celulares . . . . .	148
10.3.	Expresión recombinante de proteínas . . . . .	149
10.3.1.	Purificación con el <i>tag</i> de lectina . . . . .	149
10.3.2.	Expresión con el <i>tag</i> de 6xHis . . . . .	150
10.3.3.	Digestión con la proteasa del TEV) . . . . .	150
10.3.4.	Producción recombinante del dominio PDZ de la nNOS . . . . .	150
10.3.5.	Expresión recombinante en células de mamíferos . . . . .	151

10.4. Cosedimentación . . . . .	151
10.5. Inmunofluorescencia y microscopía confocal . . . . .	152
10.6. Electroforesis e inmunodetección . . . . .	153
10.7. Dobles híbridos de levaduras . . . . .	153
10.8. Pepscan . . . . .	155
10.9. Calorimetría de titulación . . . . .	156
10.9.1. Análisis de datos . . . . .	156
10.10 Dicroísmo circular . . . . .	157
10.10.1. Curvas de desnaturalización térmica . . . . .	158
10.11 Resonancia magnética nuclear . . . . .	158
10.12 Polarización de fluorescencia . . . . .	159
10.13 Técnicas bioinformáticas . . . . .	161

<b>Bibliografía</b>	<b>161</b>
---------------------	------------

# Índice de figuras

1.1. La familia NOS . . . . .	6
1.2. La nNOS . . . . .	8
1.3. La eNOS . . . . .	9
1.4. La iNOS . . . . .	10
1.5. Síntesis del •NO . . . . .	12
2.1. Estructura del dominio PDZ . . . . .	16
2.2. La densidad post-sináptica . . . . .	17
2.3. El dominio PDZ de la nNOS . . . . .	18
2.4. Localización subcelular de la nNOS . . . . .	20
3.1. El motor de dineína . . . . .	26
3.2. El cilio eucariota . . . . .	28
3.3. La cadena pesada de las dineínas . . . . .	31
3.4. Estructura de las cadenas intermedias . . . . .	32
3.5. Comparación de los genes de cadenas intermedias . . . . .	33
3.6. Las cadenas intermedias ligeras . . . . .	34
4.1. DYNLL a lo largo de las especies . . . . .	37
4.2. DYNLL de <i>H. sapiens</i> . . . . .	37
4.3. Estructura de DYNLL1 . . . . .	38
4.4. Estructura y dimerización de DYNLL1 . . . . .	39
4.5. El dímero de DYNLL1 . . . . .	39
4.6. El canal de interacción de DYNLL1 . . . . .	40
4.7. La Glu <sub>0</sub> de los ligandos . . . . .	41
4.8. Estructura de DYNLRB . . . . .	43
4.9. DYNLT de <i>H. sapiens</i> . . . . .	45
4.10. DYNLT1 entre especies . . . . .	45
4.11. Estructura secundaria de DYNLT1 . . . . .	46
4.12. Estructura tridimensional de DYNLT1 . . . . .	47
4.13. Superficie de DYNLT1 . . . . .	48

4.14. Interacción de ligandos con DYNLT1 . . . . .	49
4.15. Dineínas en la infección vírica . . . . .	52
4.16. Fosforilación de DYNLT1 . . . . .	54
4.17. Estructura de RagA . . . . .	57
4.18. Estructura de Rab3D . . . . .	58
4.19. Lfc . . . . .	59
5.1. Expresión del dominio PDZ de la nNOS . . . . .	67
5.2. Interacción del dominio PDZ de la nNOS con Bretdt44 por CD . . . . .	69
5.3. Interacción del dominio PDZ de la nNOS con <i>f</i> Bretdt123 por FP . . . . .	70
5.4. Interacción del dominio PDZ de la nNOS con Bretdt44 por ITC . . . . .	71
5.5. Interacción del dominio PDZ de la nNOS con <i>f</i> NOS1AP por FP . . . . .	73
5.6. Interacción del dominio PDZ de la nNOS con NOS1AP por CD . . . . .	74
5.7. Interacción del dominio PDZ de la nNOS con NOS1AP por ITC . . . . .	75
5.8. Espectros HSQC del dominio PDZ de la nNOS . . . . .	76
5.9. Esquema de las interacciones de los dominios PDZ . . . . .	77
5.10. Perturbaciones del espectro HSQC en el bolsillo de interacción . . . . .	77
5.11. Secuencias de dominios PDZ que unen un ácido en -2 . . . . .	78
5.12. Perturbaciones en Tyr77 por las interacciones de los péptidos . . . . .	79
5.13. Secuencias de dominios PDZ que unen un ácido en -3 . . . . .	80
5.14. Perturbaciones de Ser44 por las interacciones de los péptidos . . . . .	80
5.15. Interacción de <i>f</i> Bretdt123 a los mutantes del dominio PDZ de la nNOS por FP . . . . .	81
5.16. Interacción del dominio PDZ de la nNOS con PMCA-4b, por YTH y CD . . . . .	82
5.17. Interacción del dominio PDZ de la nNOS con PMCA, por FP e ITC . . . . .	83
5.18. Interacciones de diversos péptidos con el dominio PDZ de la nNOS, por CD . . . . .	85
5.19. Interacción del dominio PDZ de la nNOS con péptidos seleccionados . . . . .	86
5.20. Interacción del dominio PDZ de la nNOS con las claudinas por ITC . . . . .	87
5.21. Interacción de la nNOS con claudinas, por microscopía de epifluorescencia . . . . .	87
6.1. Región <i>Switch</i> II de las GTPasas . . . . .	91
6.2. Interacción de RagA con DYNLT1 en YTH . . . . .	91
6.3. Interacción de DYNLT1 con RagA(52-67) . . . . .	92
6.4. Interacción de DYNLT1 y RagA en células de mamífero . . . . .	93
6.5. Estructura de RagA en la región <i>Switch</i> II . . . . .	93
6.6. Espectro de CD de Rab3D . . . . .	94
6.7. Localización intracelular de DYNLT1 . . . . .	95
6.8. Localización intracelular de RagA . . . . .	95
6.9. Colocalización entre DYNLT1 y RagA y en el microscopio confocal . . . . .	97
6.10. Colocalización de DYNLT1 y RagA(52-67) . . . . .	97

6.11. Colocalización de DYNLT1 con los mutantes de RagA . . . . .	97
6.12. Cosedimentación de las GTPasas y DYNLT1 según el estado de activación . . . . .	98
6.13. Colocalización de DYNLT-IC con RagA . . . . .	99
6.14. Interacción de DYNLT-IC y RagA en dobles híbridos de levaduras . . . . .	99
6.15. Cosedimentación de DYNLT-IC y las GTPasas . . . . .	100
6.16. Complejo ternario en células de mamífero . . . . .	101
6.17. Espectro HSQC de DYNLT1 . . . . .	102
6.18. Perturbaciones de los desplazamientos químicos por la interacción de DIC y de RagA . . . . .	103
6.19. Interacción de DYNLT1 con otras GTPasas . . . . .	105
7.1. Ligandos del dominio PDZ de la nNOS . . . . .	109
7.2. Modelo de la interacción del dominio PDZ de la nNOS con Bredt44 . . . . .	111
7.3. Características de la superficie del dominio PDZ de la nNOS . . . . .	112
7.4. Modelos de interacción de los péptidos de NOS1AP . . . . .	113
7.5. Modelo de las interacciones al dominio PDZ . . . . .	115
7.6. Interacción de otros dominios PDZ . . . . .	116
7.7. HADDOCK de NOS1AP sobre el dominio PDZ de la nNOS . . . . .	118
8.1. Modos de interacción de DYNLT1 . . . . .	127
8.2. Perturbaciones de DYNLT1 por la interacción de DIC . . . . .	128
8.3. Perturbaciones de DYNLT1 por la interacción de RagA . . . . .	129
8.4. Secuencias de las GTPasas seleccionadas . . . . .	130
10.1. La construcción de DYNLT-IC . . . . .	145
10.2. DIC(130-160) . . . . .	147
10.3. Mutantes de RagA . . . . .	147
10.4. Reacción de la $\beta$ -galactosidasa . . . . .	155





# Índice de tablas

2.1. Ligandos de nNOS . . . . .	21
4.1. Estructuras de DYNLL1 . . . . .	38
4.2. Estructuras depositadas de DYNLRB . . . . .	44
4.3. Estructuras de DYNLT1 . . . . .	48
4.4. Ligandos de DYNLT1 . . . . .	50
4.5. Secuencias de los ligandos de DYNLT1 . . . . .	55
5.1. Interacción del dominio PDZ de la nNOS con los péptidos de Bredt . . . . .	68
5.2. Termodinámica de la interacción entre el dominio PDZ de la nNOS y Bredt44 . . . . .	71
5.3. Interacción de NOS1AP por dobles híbridos de levadura . . . . .	72
5.4. Termodinámica de la interacción entre el dominio PDZ de la nNOS y NOS1AP . . . . .	75
5.5. Interacción del dominio PDZ de la nNOS por CD . . . . .	85
5.6. Termodinámica de la interacción del dominio PDZ de la nNOS con péptidos seleccionados . . . . .	86
7.1. Recopilación de los datos obtenidos durante estos estudios . . . . .	122
9.1. Genotipo y fenotipo de la cepa Y190 de levaduras . . . . .	136
9.2. Anticuerpos . . . . .	138
9.3. Péptidos sintéticos . . . . .	141
9.4. Péptidos sintéticos fluorescentes . . . . .	141
10.1. Fragmentos cortos de proteínas clonados . . . . .	144



# Abreviaturas

## Generales

<b>AAA<sup>+</sup></b>	ATPasas asociadas a varias actividades celulares <i>ATPases Associated to various cellular Activities</i>
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ASFV</b>	Virus de la peste porcina africana ( <i>African Swine Fever Virus</i> )
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>CAI</b>	Centro de apoyo a la investigación
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CaMK</b>	Quinasa dependiente de calcio/calmodulina
<b>CAPON</b>	<i>Carboxy-terminal PDZ ligand of nNOS</i>
<b>CBM</b>	Centro de Biología Molecular
<b>CD</b>	Dicroísmo circular ( <i>Circular Dichroism</i> )
<b>CFP</b>	Proteína fluorescente cian ( <i>Cyan Fluorescent Protein</i> )
<b>CNB</b>	Centro Nacional de Biotecnología
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>CSIC</b>	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
<b>CPR</b>	NADPH-citocromo P450 reductasa
<b>CtBP</b>	Proteína de unión a carboxilos-terminales ( <i>C-terminal Binding Protein</i> )
<b>DMD</b>	Distrofia muscular de Duchenne ( <i>Duchenne Muscular Dystrophy</i> )
<b>DMEM</b>	Medio de Eagle modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
<b>EBML-EBI</b>	Instituto Europeo de Bioinformática ( <i>The European Bioinformatics Institute</i> )
<b>ECL</b>	Quimioluminiscencia potenciada ( <i>Enhanced ChemiLuminiscence</i> )
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal
<b>FP</b>	Polarización de fluorescencia ( <i>Fluorescence Polarization</i> )
<b>GAP</b>	Proteína activadora de la actividad GTPasa ( <i>GTPase Activating Protein</i> )
<b>sGC</b>	Guanilato ciclasa soluble
<b>GDI</b>	Inhibidora de la disociación ( <i>GTPase Dissociation Inhibitor</i> )
<b>GEF</b>	Factor de intercambio del nucleótido de guanina ( <i>Guanosine Exchange Factor</i> )
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
<b>GPCR</b>	Receptor asociado a proteínas G ( <i>G-Protein Coupled Receptor</i> )
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>HBS</b>	Tampón salino de HEPES
<b>HC</b>	Cadena pesada ( <i>Dynein Heavy Chain</i> )
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano ( <i>HorseRadish Peroxidase</i> )
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<b>IAD</b>	Dineína del brazo interno ( <i>Inner Arm Dynein</i> )
<b>IDR</b>	Región intrínsecamente desordenada ( <i>Intrinsically Disordered Region</i> )
<b>DIC</b>	Cadena intermedia ( <i>Dynein Intermediate Chain</i> )

**IFT** Transporte intraflagelar (*IntraFlagellar Transport*)  
**ITC** Calorimetría isoterma de titulación (*Isothermal Titration Calorimetry*)  
**LB** Caldo para lisogenia (*Lysogeny Broth*)  
**LC** Cadena ligera (*Dynein Light Chain*)  
**LIC** Cadena intermedia-ligera de dineína  
**MCS** Sitio de clonación múltiple (*MultiCloning Site*)  
**MDCK** Células de riñón canino (Madin-Darby Canine Kidney)  
**MTBD** Dominio de unión al microtúbulo (*Microtubule Binding Domain*)  
**MTOC** Centro organizador de microtúbulos (*Microtubule Organizing Center*)  
**MUPP1** Proteína con múltiples dominios PDZ (*Multiple PDZ Protein 1*)  
**NIDD** nNOS-interacting DHHC-Domain-containing protein  
**NOS** óxido nítrico sintasa (*Nitric Oxide Synthase*)  
**nNOS** óxido nítrico sintasa neuronal  
**eNOS** óxido nítrico sintasa endotelial  
**iNOS** óxido nítrico sintasa inducible  
**NOS1AP** NOS1 Adaptor Protein  
**OAD** Dineína del brazo externo (*Outer Arm Dynein*)  
**PBM** Motivo proteico de unión a dominio PDZ (*PDZ Binding Motif*)  
**PBS** Tampón salino de fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)  
**PMCA-4b** ATPasa dependiente de calcio (*Plasma Membrane Calcium/calmodulin-dependent calcium ATPase*)  
**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)  
**PDB** Protein Data Bank  
**PDZ** PSD-95/Dlg1/ZO1  
**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)  
**PFK-M** Fosfofructokinasa M  
**PICK1** Proteína que interacciona con PKC-1 (*Protein Interacting with C-Kinase 1*)  
**PIN** Proteína inhibidora de nNOS (*Protein Inhibitor of nNOS*)(≡ DYNLL1)  
**PKA** Proteína quinasa A  
**PKC** Proteína quinasa C  
**PKD** Proteína quinasa D  
**PKG** Proteína quinasa G  
**PSD-95** Proteína de la densidad post-sináptica de 95 kDa (*Post-Synaptic Density-95*)  
**PVDF** Difluoruro de polivinilideno  
**RBS** Sitio de unión del ribosoma (*Ribosome Binding Site*)  
**RIPA** RadioimmunoPrecipitation Assay  
**RE** Retículo endoplásmico  
**RMN** Resonancia magnética nuclear  
**SAC** Punto de control para el ensamblaje del huso mitótico (*Spindle Assembly Checkpoint*)  
**STR** Repeticiones de tipo espectrina (*Spectrin-Type Repeats*)  
**TGN** Sistema trans-Golgi (*Trans-Golgi Network*)  
**TEV** Virus del grabado del tabaco (*Tobacco Etch Virus*)  
**YPDA** Extracto de levadura, peptona, dextrosa y adenina (*Yeast extract, peptone, dextrose and adenine*)  
**YFP** Proteína fluorescente amarilla (*Yellow Fluorescent Protein*)  
**UAS** Secuencias activadoras (*Upstream Activating Sequences*)  
**UCM** Universidad Complutense de Madrid  
**YNB** Base de nitrógeno para levaduras (*Yeast Nitrogen Base*)

# Compuestos químicos

<b>3AT</b>	3-amino-1,2,4-triazol
<b>β-ME</b>	2-mercaptoetanol
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BH<sub>4</sub></b>	(6 <i>R</i> )-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DMF</b>	Dimetil formamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>DSS</b>	2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sodio
<b>EDTA</b>	Ácido etilén diamino tetraacético
<b>FAD</b>	Dinucleótido de flavina y adenina
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FMN</b>	Mononucleótido de flavina
<b>GPPNP</b>	5'-guanilil imidodifosfato
<b>cGMP</b>	Monofosfato cíclico de guanosina
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>HEPES</b>	ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazin] etanosulfónico
<b>IPTG</b>	Isopropil β-D-1-tiogalactósido
<b>NADPH</b>	Dinucleótido de nicotina y adenina
<b>Ni-NTA</b>	Níquel-nitrilotriacético
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NOHA</b>	N-hidroxil-L-arginina
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>TCEP</b>	Tris(2-carboxietil) fosfina
<b>X-Gal</b>	5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-galactopiranósido



# Resumen

Las interacciones entre proteínas son un proceso fundamental para la organización de las estructuras biológicas. La formación de complejos proteicos sirve para regular las actividades enzimáticas, organizar espacio-temporalmente las respuestas celulares a estímulos, proporcionar forma, movimiento y comunicación a las células o dirigir el transporte intracelular de orgánulos. En definitiva, todas las funciones celulares dependen de las interacciones entre sus proteínas. La pérdida de estas interacciones conlleva a la deslocalización de sus miembros, el desacoplamiento de sistemas que deben actuar en conjunto, o la desregulación de los mecanismos de control, lo que se traduce en un estado patológico.

En esta Memoria se recogen los experimentos enfocados en la caracterización de dos elementos importantes para la formación de complejos proteicos y redes de interacción con profundas implicaciones biológicas. Por un lado se ha estudiado el dominio PDZ de la nNOS, el cual es un elemento estructural y funcional exclusivo de esta isoforma, y sirve para asociarse a grandes complejos proteicos.

El óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) es un señalizador celular sintetizado por las enzimas NOS, que está cobrando cada vez más importancia por sus acciones a nivel vascular, neuronal e inmunológico y por su implicación en patologías y enfermedades. Debido a la naturaleza difusible y reactiva del  $\bullet\text{NO}$ , su síntesis tiene que estar restringida al momento y al lugar adecuado, y además de los mecanismos de regulación generales a nivel catalítico presentes en las NOSs, la nNOS puede tener un factor adicional de regulación controlando su localización subcelular gracias al dominio PDZ que presenta en su extremo N-terminal.

Los dominios PDZ (de PSD-95, DlgA, ZO1) son módulos estructurales que median la formación de complejos, y pueden estar aislados o en tándem para esta tarea. Tienen unos 90 aminoácidos que se distribuyen en seis cadenas  $\beta$  (1 a 6) y dos hélices  $\alpha$ . Hay que destacar el lazo de unión del grupo carboxilato, que conecta las hebras  $\beta 1$  y 2, y reconoce específicamente el grupo carboxilato del extremo C-terminal del ligando.

Los dominios PDZ tienen varios mecanismos de acción, y el denominado estándar consiste en el reconocimiento de secuencias presentes en el extremo C-terminal de sus ligandos, que se insertan en un bolsillo hidrófobo que se forma entre el bucle -GLGF-, la hebra  $\beta 2$  y la hélice  $\alpha 2$ . Estas secuencias abarcan entre cuatro y ocho aminoácidos del extremo C-terminal, que tradicionalmente han sido clasificadas en tres tipos principales, en función de las secuencias consenso de los cuatro últimos ami-



noácidos, y en concreto, de la identidad del residuo -2 (siendo el 0 el aminoácido del extremo): las de tipo I ( $x[S/T]x\Phi^*$ ), las de tipo II ( $-x\Phi x\Phi^*$ ) y las de tipo III ( $-x[D/E]x\Phi^*$ ) donde  $\Phi$  es un aminoácido hidrofóbico. La importancia de estos residuos está bien establecida, pues la eliminación, adición o sustitución de alguno de ellos puede afectar a la asociación. Además de estos tipos principales, se han ido describiendo y caracterizando la importancia de los otros aminoácidos en la interacción.

El dominio PDZ de la nNOS tiene su relevancia en ser uno de los muy pocos dominios PDZ que reconocen secuencias de tipo III, pero destaca el hecho de que entre sus ligandos conocidos haya secuencias de todos los tipos (tipo I, tipo II y tipo III), con una variabilidad poco común. Más aún, el dominio PDZ de la nNOS tiene una característica particular, que es la presencia de una extensión en su extremo C-terminal que se pliega en horquilla  $\beta$  y está directamente implicada en la interacción con otros dominios PSD-95/Dgll/ZO1 (PDZ). De hecho, desde su caracterización inicial no ha podido establecerse con precisión una secuencia consenso que dirija la asociación a éste dominio PDZ.

Por todo ello, uno de los **objetivos** fundamentales de la presente Tesis Doctoral ha sido analizar requerimientos secuenciales que han de mostrar los extremos C-terminales de proteínas celulares capaces de unirse al dominio PDZ de la nNOS. Desde un punto de vista metodológico, en la primera parte de esta Tesis se recurrió al uso técnicas de bioquímica y biología celular, como el dicroísmo circular, la calorimetría, la espectroscopía de RMN o la microscopía confocal para caracterizar este dominio y tratar de definir los mecanismos moleculares que rigen sus interacciones.

Comenzando por las secuencias descritas originalmente, se sentaron las bases metodológicas para el resto del estudio. Se confirmó la preferencia del dominio PDZ de la nNOS por las secuencias de tipo III (especialmente aquellas acabadas en -GDAV\*), con las que se une con alta afinidad. A continuación se procedió a caracterizar uno de los ligandos de los que más literatura se ha publicado, la proteína NOS1AP/CAPON, cuya secuencia es de tipo II (-DEIAV\*). Los **resultados** presentados en esta Tesis confirmaron que puede unirse al dominio PDZ de la nNOS, que esta asociación es de menor afinidad que las secuencias anteriores, y que esta unión es independiente de la que está mediada por la horquilla  $\beta$ . Además, se utiliza esta secuencia como precedente de otras proteínas que comparten la presencia de un aminoácido ácido en la posición -3. Seguidamente, se utilizó la espectroscopía resonancia magnética nuclear (RMN) para se determinaron los aminoácidos del PDZ que son importantes para estas interacciones, con el fin de predecir el comportamiento del dominio PDZ ante otras secuencias, y se estableció la función de los residuos Tyr77 para el reconocimiento de las secuencias de tipo III, y Ser44 para la unión de las secuencias con un residuo ácido en la posición -3. Tras ello, se buscó definir un modelo de comportamiento general con los ligandos descritos en la literatura, y se vio que, en general, la nNOS puede acoger secuencias con una gran variabilidad pero con poca afinidad. Se finalizó esta parte con la identificación y estudios preliminares de ligandos del dominio PDZ de la nNOS no caracterizados, como las claudinas-3 y -14, un tipo de proteínas de membrana de las uniones estrechas.

Los datos aquí presentados permitieron **concluir** que el dominio PDZ de la nNOS muestra una gran plasticidad en cuanto al reconocimiento de secuencias C-terminales estructuralmente muy diver-

sas.

La segunda parte de esta Tesis consistió en el estudio en profundidad de la proteína DYNLT1, una cadena ligera de dineína.

Las dineínas son un motor molecular que se translocan por los microtúbulos en sentido negativo, y median numerosas funciones relacionadas con el transporte microtubular, como son la función ciliar (movimiento de cilios y flagelos), la localización de orgánulos celulares o la distribución de proteínas, y son un sistema utilizado por muchos virus durante su ciclo infeccioso para establecerse y moverse por la célula. Son un gran complejo que se forma por el ensamblaje de sus componentes, por un lado un subcomplejo con las cadenas pesadas e intermedias ligeras, y por otro, el subcomplejo con las cadenas intermedias y las tres familias de cadenas ligeras, DYNLL, DYNLT y DYNLRB.

Son muchos los conocimientos que se tienen sobre la estructura y función de la cadena ligera DYNLL1, pero mucho más exigüos los de DYNLT y DYNLRB. DYNLL y DYNLT comparten algunas características, como su topología, su condición dimérica, sus elementos de estructura secundaria o su estructura global, pero no tienen homología. Sus funciones en general son promover la dimerización de proteínas celulares y virales. Ambas proteínas se unen a la cadena intermedia de las dineínas de forma dimérica, de tal forma que en el proceso de dimerización aparecen los sitios simétricos de unión de la DIC. DYNLL y DYNLT1 interactúan con DIC en dos segmentos consecutivos localizados en mitad de una región intrínsecamente desordenada, pero también se asocian a un número creciente de proteínas celulares y virales. Este amplio abanico de interacciones puede llevar a la conclusión de que las cadenas ligeras actúen como adaptadores de cargamento para todas estas proteínas. Esta hipótesis fue descartada para DYNLL1, pero no así para DYNLT1.

Entre todas las proteínas que se asocian a DYNLL, sus secuencias se pueden alinear para definir dos secuencias consenso, una mayoritaria (-KSTQT-), presente en la DIC y en muchas otras, y otra más minoritaria (-GIQVD-), presente en la nNOS. Sin embargo, el número de proteínas que se asocian con DYNLT es menor, y con una mayor variabilidad de sus secuencias, por lo que no ha sido posible establecer una secuencia consenso que dirija esta interacción. Además se vio la posibilidad de que DYNLT1 puede asociarse simultáneamente a la DIC y a otras proteínas celulares, reabriendo el debate de su función como adaptadores de cargamento o como meros componentes estructurales.

Así pues se desarrollaron un conjunto de experimentos enfocados a la caracterización de las interacciones con DYNLT. El **objetivo** de esta parte es determinar qué requerimientos de secuencia han de presentar las proteínas capaces de unirse a DYNLT1.

Mediante técnicas habituales de bioquímica y biología celular, se realizó un barrido sistemático de las proteínas con las que interacciona, poniendo especial énfasis en dos de ellas, las GTPasas Raga y Rab3D, cuya asociación fue descrita en sendos estudios separados unos 15 años entre sí, siendo relevante el hecho de que pertenezcan a la misma familia. Se confirmaron las interacciones por medio de la metodología de doble híbridos de levadura, en un conjunto de experimentos que permitió a su vez restringir la asociación interacción a un corto segmento de unos 15 aminoácidos con secuencias no homólogas a la del ligando canónico (la DIC). Debido a esta falta de homología se estudió la

posibilidad de que las GTPasas y la DIC se unan a DYNLT en dos regiones distintas, lo que permitiría la asociación simultánea y abriría las puertas a un modelo de transporte microtubular, o al menos de localización subcelular. Para ello se diseñó un modelo experimental, en el que la secuencia de la DIC fue fusionada a continuación de la secuencia de DYNLT, para que, en la traducción, DYNLT se pliegue, forme el dímero y ocupe el sitio donde interaccionaría la dineína. Esta forma auto saturada evitaría la inserción de las proteínas que se unan en el canal hidrofóbico formado en la interfase de los dos monómeros, el denominado sitio canónico, pero dejaría el resto de la superficie proteica libre para la posible interacción de otras proteínas. Esta aproximación permitió el estudio de la formación de los complejos ternarios en solución.

Este modelo fue primero validado, tanto en levaduras como en células de mamíferos, y después estructuralmente por RMN. Fue entonces aplicado para el estudio de la interacción con las GTPasa, y se vio que, mientras que la DIC no podía unirse al tener su sitio ocupado, las GTPasas sí que interaccionaron, demostrando fácilmente que existe una superficie de interacción distinta. Es más, en los **resultados** de la presente Memoria se demuestra que DYNLT1 y RagA podían asociarse a DIC, y formar así un complejo triple que pudiera asociarse a los microtúbulos, ya sea para su transporte como para su retención específica y separación de los lugares de acción. La caracterización de esta nueva superficie fue realizada por resonancia magnética nuclear (RMN), mediante el uso de proteína recombinante marcada con  $^{15}\text{N}$  y de péptidos sintéticos. Con ellos se identificaron sobre la secuencia de DYNLT aminoácidos importantes para la interacción con DIC y con RagA, y se pudo **concluir** que había un patrón claramente diferenciado.

DIC producía alteraciones en los aminoácidos típicos para una inserción en el canal hidrofóbico, mientras que RagA producía alteraciones en una superficie extensa cercana al extremo N-terminal de DYNLT. Habiéndose definido la interacción entre DYNLT y dos GTPasas, se estudió la posibilidad de que no fueran las únicas así que se buscaron nuevas posibles interacciones con otras GTPasas, y se encontró que, de todas las GTPasas analizadas, sólo la GTPasa Arl2 (de la subfamilia Rho) fue capaz de asociarse con DYNLT1.

# Summary

Protein interactions are fundamental processes for the organization of the biological structures. Protein complexes are assembled during the regulation of enzymatic activities, the spatial and temporal organization of cell responses, mediate movement and communication between cells, direct the intracellular transport of cell organelles and the regulation of every single cellular function is dependent of the interrelationships of several proteins. Loss of these interactions means the misslocalization of their members, the uncoupling of the systems that act together or the dysregulation of control mechanisms hence leading to pathologies.

This Dissertation assesses the characterization of two important elements in the assembly of large protein complexes and interaction networks, both of them with profound biological implications. On the one hand, the PDZ domain of neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) was studied, which is an exclusive element of this NOS isoform, and it drives the association of nNOS to the protein complexes where it exerts its function.

Nitric oxide is a small signaling molecule synthesized by the NOSs enzymes. It is becoming increasingly relevant, because it has important functions in neural, vascular and immunological physiology, and it has been implicated in pathologies and diseases. Due to its highly diffusible and reactive nature, •NO has a highly regulated synthesis in a spatial and temporal manner, and in addition to the general regulation of the catalytic activity of NOSs, nNOS in particular has an added point of regulation by the control of its subcellular localization, thanks to the presence of the PDZ domain at its N-terminus.

PDZ domains (after PSD-95, DlgA and ZO1 proteins) are structural interaction modules that mediate the assembly of protein complex, being one or multiple PDZ domains in tandem per protein. They have around 90 amino acids, with a 3D-fold comprised of six  $\beta$  strands and two  $\alpha$  helices. Of importance is the -GLGF- loop that tethers the carboxi-terminal group of the ligand peptide. PDZ domains have several interaction modes, of which the canonical one consists of the recognition of its ligands' C-terminal sequences into a binding groove between the -GLGF- loop, the  $\beta$ 2 strand, and  $\alpha$ 2 helix. The sequences of the ligand proteins take from four to eight residues of the C-terminus. They have been traditionally classified into three main groups, after the identity of the residue in position -2, from the end. type I sequences (-x[S/T]x $\Phi$ \*), type II sequences (-x $\Phi$ x $\Phi$ \*) and type III sequences (-x[D/E]x $\Phi$ \*) where  $\Phi$  is a hydrophobic amino acid. The importance of these residues has been well established, since the addition, deletion or substitution of one of them may be sufficient to abrogate the

interaction.

Beyond these main types of sequences, several other positions have been described and characterized as important determinants of subtypes and fine-tuning binding ligands. nNOS PDZ domain is one of the few PDZ domains that binds to type III sequences, although it is worthy to mention that among its ligands there are sequences from the other types, with uncommon recognition variability. Furthermore, it has an extra feature, a C-terminal extension folded into a  $\beta$ -hairpin conformation, directly associated with the binding to other PDZ domains. In fact, since its first characterization, it has not been possible to precisely define the consensus sequence that rules the recognition of this PDZ domain.

From a methodological point of view, the first part of the Work presented here consisted in the use of biochemical and cellular biology techniques, such as circular dichroism, isothermal titration calorimetry, nuclear magnetic resonance spectroscopy and confocal microscopy, with the intention of identifying the molecular mechanism that controls these interactions.

First of all, the consensus sequence described earlier has been revised, and the methodologies were tested. The preference of the nNOS PDZ domains for the type III sequences was confirmed, particularly those ending in -GDAV\*, for which nNOS displays a high affinity binding. Next, the most prominent ligand was characterized. The protein NOS1AP/CAPON has a type II C-terminal sequence (-DEIAV\*), and the binding to PDZ domain was confirmed. This binding is weaker than the former one, and it is independent of the binding state of the  $\beta$ -hairpin. Furthermore, this sequence precedes the analyses over other ligands that contain an acid residue in the -3 position. Afterward, NMR spectroscopy was used to perform a fine structural analysis, in which the important amino acids that determine the preferential binding to one sequence over another were identified. The importance of Tyr 77 for type III sequences binding and Ser44 for the recognition of the acid residue in -3 site were verified. It was later investigated a general model for the binding to the other ligands that were described in the literature. In general, the **conclusions** of the present Work indicate that the nNOS PDZ domain has lost affinity but gained an increased recognition pattern.

This part was finalized with the identification and preliminary analyses of some non-characterized binding patterns, such as claudins-3 and -14, two tight-junction proteins.

On the other hand, the second part of this Work was an in-deep study of the DYNLT1 dynein light chain.

Dyneins are the molecular motors that translocate by the microtubule network in a minus end directed movement, and drives several functions related to this activity, such as flagellar movement, cell organelle localization and protein sorting. It is also used by some virus to travel through the cell cytoplasm during their viral cycle. Dyneins are a large complex assembly, composed of two subcomplexes. One of them has the dynein heavy chains, (HC) and light-intermediate chains, whereas the other has the dynein intermediate chain (DIC) and three families of light chains, DYNLL, DYNLT and DYNLRB.

Several studies have fed the general knowledge of the structure and function of the DYNLL light

chain, but much less is known about the other two members, DYNLT and DYNLRB. DYNLL and DYNLT share several common features, such as their topology and overall folding, dimerization and secondary structure elements, but they are not homologous in their sequences. Their general function is to induce or promote the dimerization of other cellular proteins. Both proteins bind to two DIC polypeptides in a dimeric and symmetric manner, due to the dimeric nature of the light chains. When the light chains dimerize, they form the binding groove in the dimeric interphase, where they insert the DIC peptide. Light chains (LCs) binds to two consecutive sequences in the middle of an intrinsically disordered region of the DIC peptide, but they also bind to an increasing number of cellular and viral proteins. This multiple interaction initially led to the conclusion that LCs might serve as adaptor proteins for attachment and transport by the dynein motor. This idea was discarded for the DYNLL protein, but not DYNLT.

All the proteins that bind to DYNLL shares one of the two consensus identified, the -KSTQT- motif, present in DIC, and the -GIQVD- motif of nNOS. However, the number of proteins known to bind to DYNLT is very limited, with a higher diversity in their amino acid sequences. Thus, it has not been possible to establish a consensus sequence that rules the association to DYNLT. In addition, DYNLT may bind proteins in a distinct surface than the canonical interphase groove, then it is feasible that it might act as an adaptor protein.

During the second part of the present Work, a set of biochemical and cellular techniques were used to characterize the binding of cellular proteins to the DYNLT1 dynein light chain, emphasizing two of them: The small GTPases RagA and Rab3D. Their interaction with DYNLT was described with 15 years difference, and it is worth mentioning that they belong to the Ras GTPases superfamily, although they have distinct and unique features. The interaction of these GTPases to DYNLT1 was confirmed by means of the yeast two hybrid (YTH) assay, and the interaction was then reduced to a stretch of around 15 amino acids, with no homology with other known binders.

Our results indicate that due to this lack of homology, the “adaptor protein” hypothesis was challenged, arguing that, if DIC and the GTPases do not share the same binding groove, they might bind to two separate DYNLT1 surface residues areas. Hence, the small GTPases may binds simultaneously to the DYNLT and then, attach to the dynein motor for a microtubular transport or subcellular compartment to take place. In order to test this possibility, an experimental model was developed, in which the DYNLT binding sequence from DIC was fused after the DYNLT sequence. It was assumed and confirmed that, after the translation, the DIC sequence inserts and self-saturates its own formed groove, leaving the rest of the protein surface free for binding. This approach allowed studying the assembly of ternary complexes in solution. This model was validated in YTH and cellular coexpression, and then with structural analysis by NMR. It was then applied to the study of the ternary binding between DYNLT, the GTPase RagA and DIC. It is shown that while DIC is unable to bind to the self-saturated DYNLT construct, RagA and Rab3D was found to bind it, and thus a tripartite complex could be demonstrated.

The characterization of the binding surface was performed by means of NMR spectroscopy, using

<sup>15</sup>N-labelled DYNLT1 against unlabeled DIC and RagA synthetic peptides. The important amino acids for the binding of the DIC and the Rag A peptides were identified, and in the conclusion section we confirmed that they bound to a different surface.

Subsequently, with the interaction confirmed, a search for novel GTPases that could bind to DYNLT1 were performed, and one GTPase (namely Arl2, a member of the Rho subfamily) was identified as a novel DYNLT interacting partner.

# **Parte I**

## **Introducción**





# Capítulo 1

## Óxido Nítrico Sintetasas

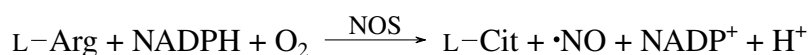
### Un gas como señalizador

El óxido nítrico es un señalizador diferente. Es una pequeña molécula, gaseosa y difundible que fue una gran sorpresa en el campo de la fisiología, más aún cuando se descubrió que era un contaminante del aire bastante común. Su descubrimiento y caracterización como sustancia biológica de interés sanitario fue motivo del premio Nobel de Medicina y Fisiología de 1998.



## 1.1. Las óxido nítrico sintasas

Las óxido nítrico sintasas (NOSs) son hemoproteínas que catalizan la formación de óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) a partir de L-arginina, de una forma dependiente de NADPH y liberando citrulina como subproducto. Las NOSs tienen la clasificación de la *Enzyme Commission* EC 1.14.13.39, están incluidas en el grupo de las oxidorreductasas, porque catalizan el flujo de electrones desde el NADPH hasta el  $\bullet\text{NO}$  como producto final.



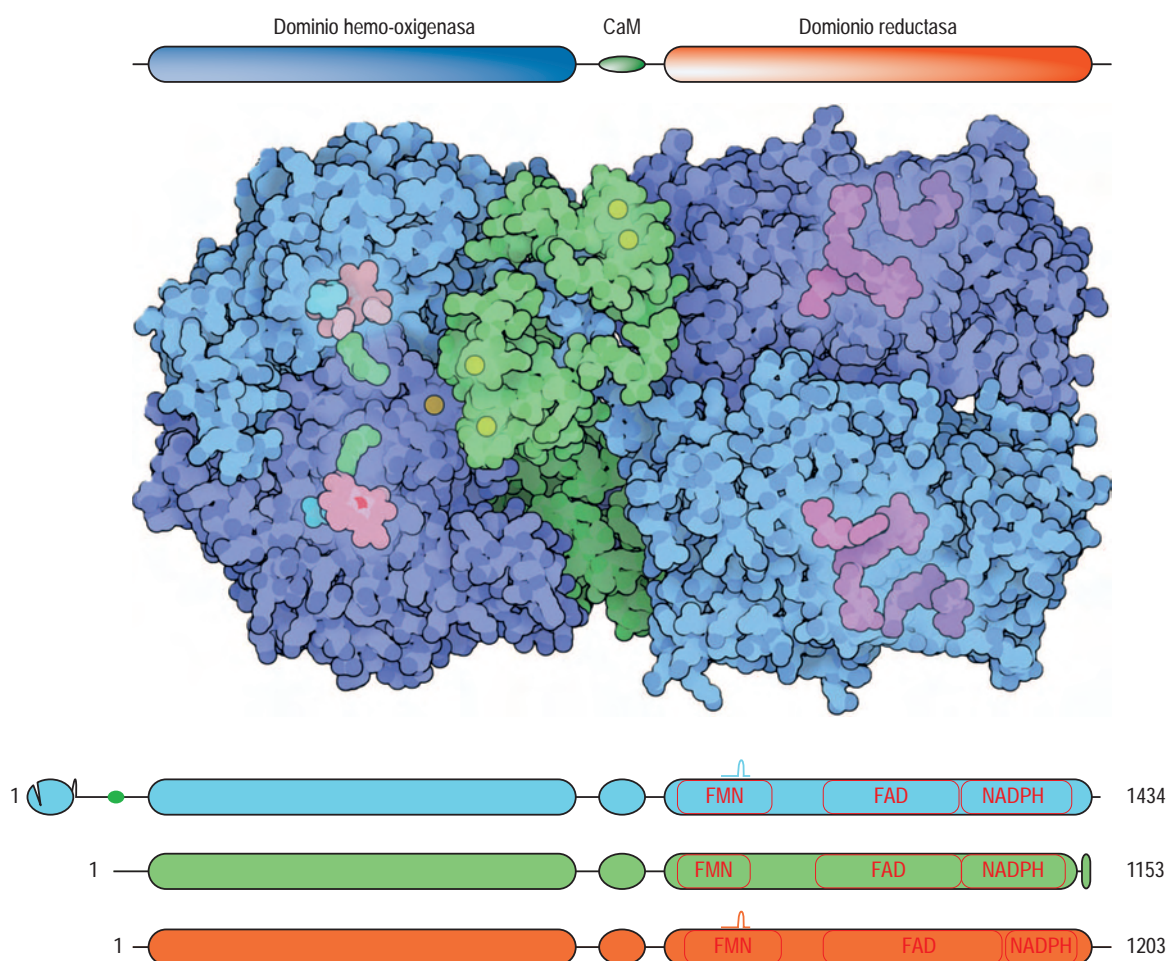
La síntesis de óxido nítrico por parte de las NOSs se identificó por vez primera en el cerebelo, aunque posteriormente se detectó actividad NOS en otros tejidos. La primera enzima descrita con actividad NOS fue la isoforma NOS1, u óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), gracias a los experimentos de David Bredt y Solomon Snyder con extractos de cerebros de rata, donde, tras varias etapas cromatográficas fueron capaces de aislar una proteína de unos 160 kDa con actividad óxido nítrico sintasa. Era una proteína en la que se identificaron dos regiones, un dominio N-terminal, sin homología conocida, y un dominio C-terminal homólogo a la citocromo P450 reductasa [1]. Posteriormente se identificarían en mamíferos las otras isoformas, una inducible (óxido nítrico sintasa inducible, iNOS) y otra específica del endotelio (óxido nítrico sintasa endotelial, eNOS), homólogas a nNOS y con un alto grado de identidad de secuencia [2].

### 1.1.1. Estructura general

Las NOSs son grandes enzimas homodiméricas, que a pesar de haber algunas diferencias importantes entre las isoformas descritas más adelante, comparten una estructura común. Están constituidas por dos grandes dominios de plegamiento independiente, unidos por una región que contiene una secuencia de unión de la calmodulina (CaM). Estos dos dominios constituyen el corazón catalítico (Fig. 1.1).

**El dominio hemo-oxigenasa** abarca aproximadamente la mitad N-terminal de la proteína, y es funcionalmente similar a los citocromos P450, aunque sin homología de secuencia (los citocromo p450 y las NOS no comparten un patrón de plegamiento). Contiene el sitio de unión para el sustrato L-Arg, colocándolo sobre el grupo hemo, y para el cofactor (6*R*)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), cuya unión en el entorno del grupo hemo produce alteraciones en el campo electrónico del átomo de hierro [3], el cual está coordinado con una cisteína que actúa de ligando axial. En su lado N-terminal, el dominio oxigenasa contiene un motivo zinc-tiolato, en el que un átomo de zinc se coordina con los grupos tiol de dos pares de cisteínas aportados por cada monómero y colocados en la interfase del dímero, que contribuyen sustancialmente a la estabilidad del dímero, y por extensión, a la función catalítica de la enzima [4, 5].





**Figura 1.1:** Dominios estructurales de las óxido nítrico sintasas. Las NOSs son enzimas homodiméricas formadas a su vez por dos dominios, el dominio reductasa que extrae los electrones del oxígeno molecular, y el dominio oxigenasa, que sintetiza el  $\bullet\text{NO}$  a partir de L-arginina. Ambos dominios están conectados por un péptido que tiene una secuencia de unión de la calmodulina. Las tres isoformas comparten el núcleo catalítico, pero difieren en algunas características particulares. La nNOS (azul) contiene una extensión N-terminal con un dominio PDZ para su localización subcelular y un sitio de unión de la cadena ligera DYNLL1; la iNOS (verde) contiene una extensión C-terminal con una función automoduladora, e incluye un motivo de unión a PDZ de tipo I ( $-\text{X}[\text{S/T}]\text{X}[\text{V/L}]^*$ ), y la eNOS puede ser palmitoilada y miristoilada en su extremo N-terminal. En el dominio reductasa están los sitios de unión de los nucleótidos FAD, FMN y NADPH. Se representa a su vez el lazo autoinhibitorio presente en la nNOS y la eNOS.

**El dominio reductasa** corresponde a la mitad C-terminal de la proteína. Contiene los sitios de unión para el sustrato NADPH, que actúa como donador de electrones, y para los cofactores FMN y FAD, y tiene homología con la proteína NADPH-citocromo P450 reductasa (CPR) y con enzimas flavina-reductasas. Las isoformas nNOS y eNOS tienen un bucle que desestabiliza la interacción de la CaM a bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , e inhibe la transferencia de electrones entre el FMN y el grupo hemo.

**El sitio de unión de calmodulina** es una región de unos 20 aminoácidos que conecta los dos dominios principales. Las tres isoformas requieren la unión de CaM, aunque sólo la nNOS y la eNOS son sensibles a los cambios en los niveles de calcio, pues la iNOS se encuentra totalmente activa con la

concentración basal del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

**Los elementos autoinhibitorios** son regiones de las NOSs que bloquean la actividad enzimática propia. Hay tres elementos autoinhibitorios:

**La extensión C-terminal** es una extensión de unos 20 a 40 aminoácidos cuya longitud determina la tasa de síntesis de  $\bullet\text{NO}$ . Es una hélice  $\alpha$  que bloquea la transferencia de electrones al plegarse sobre el dominio reductasa, interfiriendo en la interacción entre las flavinas [6]. Contiene una secuencia de fosforilación con una serina conservada donde converge la actividad de varias quinasas para controlar la actividad de la enzima, pues la fosforilación de esta serina desplaza el lazo autoinhibitorio y permite el flujo de electrones. Sin embargo, en la forma inducible, esta extensión contiene un dominio de unión a PDZ, por lo que su regulación se da por un mecanismo diferente.

**la extensión autoinhibitoria** es una inserción de unos 50 aminoácidos en el dominio reductasa, en mitad del dominio de unión del FMN que no está presente en la iNOS. Su función inhibitoria es realizada impidiendo la asociación de la CaM, evitando que ésta induzca la transferencia de electrones entre el FMN y el grupo hemo [7].

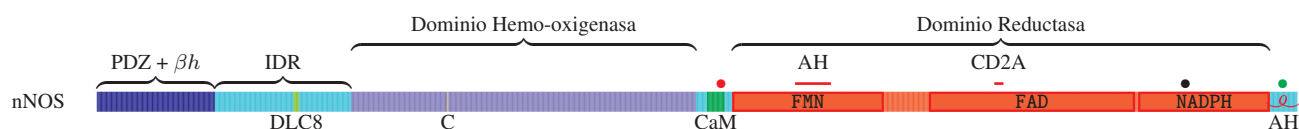
**El lazo CD2A** es una secuencia corta presente en la región que une los subdominios de unión de las flavinas y tiene una función atenuante de la actividad porque interfiere con la interacción de la CaM, actuando de forma cooperativa con el lazo autoinhibitorio [8].

## 1.2. La familia NOS

Existen en mamíferos tres genes de óxido nítrico sintasas, que mediante procesamiento alternativo del ARNm y modificaciones post-traduccionales, pueden dar lugar a varias isoformas distintas con una distribución tisular diferenciada y una importante regulación intracelular [2]. Con tamaños comprendidos entre los 130 y los 160 kDa, son homólogas, y comparten una identidad global del 55 %, siendo aún mayor en las regiones implicadas en las catálisis. Las diferentes isoformas tienen propiedades bioquímicas comunes y un esquema catalítico similar, descrito en la sección 1.3.1.

### 1.2.1. La nNOS

La óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) fue la primera enzima con actividad sintasa de óxido nítrico descrita [1]. Con 160.8 kDa, es la forma más grande, cuya principal característica es la presencia de una extensión N-terminal de unos 300 aminoácidos que incluye el característico dominio PDZ. Es expresada de forma constitutiva en neuronas específicas del cerebro, pero también se ha encontrado en médula espinal, ganglios simpáticos, glándulas adrenales y nervios nitrérgicos, y fuera del sistema nervioso, en células epiteliales de diversos órganos, islotes del páncreas y en los miocitos del músculo liso vascular, músculo cardíaco y músculo esquelético [2, 9], tanto en forma particulada como en la



**Figura 1.2:** La nNOS. Dominios y características de la nNOS, resaltando los dominios hemo-oxigenasa y reductasa, el sitio de unión de la calmodulina, el dominio PDZ y la región intrínsecamente desordenada (*Intrinsically Disordered Region*, IDR) con el sitio de unión de DYNLL1/DLC8. ●: Sitios de fosforilación, activadoras en verde e inhibidoras en rojo; C es la Cys420, el ligando axial del hierro en el grupo hemo.

fracción soluble, y esta localización subcelular diferente contribuye a la regulación de sus funciones [10]. Gracias al procesamiento alternativo del ARNm pueden aparecer cinco isoformas: nNOS  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  y nNOS-2, y por ello la nNOS está sometida a un complejo control transcripcional.

La nNOS puede ser regulada por fosforilación, con efectos diferentes según la posición. Proteínas quinasas como la proteína quinasa A (PKA), la PKC o la quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK), y la más recientemente descrita proteína quinasa D (PKD) [11], fosforilan a nNOS de forma dependiente de factores internos y externos a la célula. La posición Ser852 (en *H. sapiens*) es fosforilada por CaMK-I, con un efecto inactivador [12], al igual que la Ser746 [13], mientras que la fosforilación en el extremo C-terminal es activadora [14] (Fig. 1.2).

### La extensión N-terminal de la nNOS

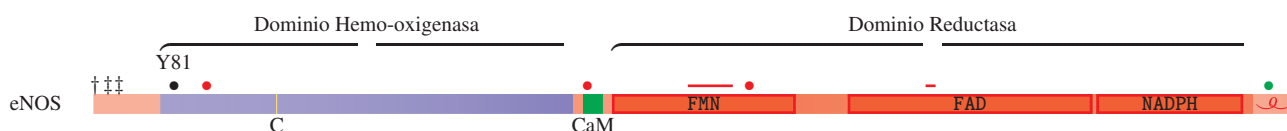
A diferencia de la eNOS y la iNOS, la nNOS posee una extensión N-terminal de unos 300 aminoácidos que no forma parte del núcleo catalítico de la enzima. La delección de esta región muestra la misma actividad catalítica que la proteína silvestre, lo que sugiere que ésta puede tener otras funciones relacionadas con la distribución subcelular de la enzima [15], a través de la presencia de numerosas señales de localización. La característica más relevante de esta extensión es la presencia de un dominio PDZ (de PSD-95, Dg11, ZO1) [1], seguido de una horquilla  $\beta$  [16]. A continuación se encuentra una región intrínsecamente desordenada, que incluye el sitio de unión de la proteína DYNLL1 (anteriormente conocida como PIN/DLC8) [17].

Así pues, por ejemplo en la membrana post-sináptica, la nNOS puede asociarse a varias proteínas a través de su dominio PDZ y su horquilla  $\beta$ . Mediante interacciones laterales puede interactuar con otros dominios PDZ de proteínas como PSD-95 o  $\alpha$ 1-sintrofina [18], a la vez que puede recibir extremos C-terminales de carácter ácido, como el de la proteína CAPON/NOS1AP, y de este modo forma parte de los grandes complejos proteicos de la región post-sináptica. Por otro lado, en células musculares puede interactuar con las repeticiones de espectrina de la distrofina, reclutándose en el sarcolema para regular aquí la actividad muscular [19] (ver 2.4a). La relevancia de este dominio PDZ da lugar a una descripción más detallada en el capítulo 2.

## La región intrínsecamente desordenada de la nNOS

Este segmento desordenado abarca desde la horquilla  $\beta$  hasta el inicio del dominio hemo-oxigenasa, y contiene el sitio de unión de la cadena ligera de dineína DYNLL1 [17]. Originalmente, DYNLL1 fue identificada como proteína inhibidora de nNOS ( $\equiv$  DYNLL1) (PIN) [20], una proteína que parecía reducir la actividad de nNOS mediante la inducción de su monomerización, aunque se pudo comprobar posteriormente que podía haber asociación de DYNLL1 sin inhibición ni monomerización de nNOS [17]. Dado que DYNLL1 es una proteína dimérica que une ligandos bivalentes de forma simétrica, la función de esta interacción puede ser estabilizar el dímero de nNOS para optimizar su actividad catalítica.

### 1.2.2. La eNOS



**Figura 1.3:** La eNOS. †: Miristoilación de Gly2; ‡: Palmitoilaciones de Cys15 y Cys26; •: sitios de fosforilación, activadoras en verde e inhibidoras en rojo; C es la Cys184, ligando axial del hierro en el grupo hemo.

La enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS,  $\equiv$  NOS3) también tiene una expresión constitutiva, pero con una distribución tisular diferente a la nNOS. Fue identificada en 1992 por Santiago Lamas [21] en células del endotelio, aunque también se ve expresada en cardiomiocitos, plaquetas, el sincitio-trofoblasto de la placenta humana y células epiteliales del túbulo renal.

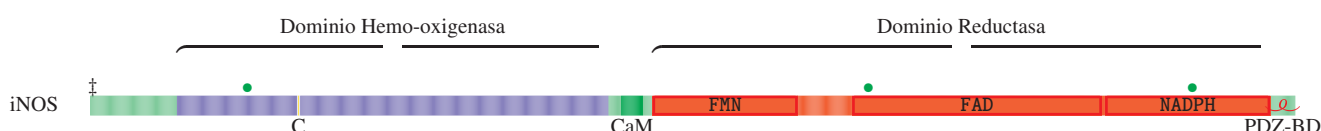
Se caracteriza por estar miristoilada (Gly2) y palmitoilada (Cys15, Cys26), lipidaciones implicadas en la localización intracelular a subdominios de membrana de tipo *raft* y caveolas [22], y por la producción de  $\bullet$ NO en pulsos, que gracias a la extraordinaria sensibilidad al  $\bullet$ NO del entorno próximo al endotelio, permite que la aparición de tan sólo 1 pM de  $\bullet$ NO pueda producir la producción de hasta 30 nM de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), más que suficiente para desencadenar de la ruta de la proteína quinasa G (PKG)[23].

Mientras que la miristoilación es una modificación irreversible, las palmitoilaciones son reversibles y reguladas con participación de la secuencia con repeticiones -GL- que rodean a las cisteínas. Las lipidaciones, aunque no afectan directamente a actividad enzimática porque no forman parte del núcleo catalítico, controlan su localización subcelular (la miristoilación lleva a la membrana, y las palmitoilaciones la dirigen a las caveolas, ricas en colesterol y esfingomielina) para restringir la producción de  $\bullet$ NO a las caveolas, donde se reúnen con multitud de proteínas de todo tipo como proteínas G, canales de calcio o receptores asociados a proteínas G (GPCRs), entre otras. Esto hace que la eNOS, a diferencia de nNOS e iNOS que son fundamentalmente solubles, aparezca mayoritariamente asociada a los microdominios de membrana.



En un estado basal, la eNOS se mantiene inactiva mediante su colocación con las caveolinas y por la fosforilación constitutiva en la Thr495, que impide la unión de la CaM. Cuando la célula recibe el estímulo adecuado, se promueve la desfosforilación de Thr495 que permite la unión de CaM, se fosforila la Ser1177, eNOS se disocia de la caveolina y todo ello conduce, en este orden, a la activación de eNOS y su translocación al aparato de Golgi [24]. Aunque las fosforilaciones de Thr495 y Ser1177 son las más estudiadas, existen otras posiciones que regulan la actividad de eNOS frente a numerosos estímulos (Fig. 1.3).

### 1.2.3. La iNOS



**Figura 1.4:** La iNOS y sus características. †: Palmitoilación de Cys3; •: Sitios de fosforilación, activadores en verde e inhibidores en rojo; C es la Cys200, ligando axial del hierro en el grupo hemo. Se indica el extremo C-terminal que incluye un motivo de unión a PDZ de tipo I.

La isoforma óxido nítrico sintasa inducible (iNOS,  $\equiv$  NOS2) es la única que tiene una expresión inducible, que tradicionalmente se decía que se activa en presencia de toxinas y procesos inflamatorios, aunque esta afirmación se ha ido matizando. La iNOS puede aparecer de forma constitutiva en algunas células y, bajo ciertas circunstancias, la expresión de nNOS y eNOS puede verse inducida ante determinados estímulos [25]. Su expresión basal es baja, pero aumenta como parte de la respuesta inflamatoria sistémica en monocitos/macrófagos, hepatocitos y otras células. El  $\bullet$ NO generado contribuye a la defensa bactericida de los fagocitos y demás células de defensa en un proceso conocido como estallido respiratorio, aunque poco a poco se van desvelando funciones más generales en la señalización celular o en otros procesos fisiológicos, como la reabsorción del hueso. La calmodulina se asocia de forma co-traducciona y su unión es esencialmente irreversible.

Contiene una extensión de 21 aminoácidos en el extremo C-terminal que se inserta en un canal del dominio reductasa, ralentizando la transferencia de electrones, y aunque no se conoce con precisión su función. La secuencia C-terminal de la iNOS contiene una secuencia de unión a dominios PDZ de tipo I ( $-X[S/T]X[V/L]^*$ ). La unión de dominios PDZ al carboxilo de la iNOS desplaza este elemento autoinhibitorio, que conduce a la activación de la enzima [26, 27].

También se ve palmitoilada en la posición Cys3, modificación estrictamente necesaria para su actividad [28, 29], ya que permite su translocación desde los lugares de síntesis a los puntos de actividad.

### 1.3. El óxido nítrico

El óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) es un mensajero biológico con un papel muy importante en las funciones fisiológicas de los sistemas cardiovascular, nervioso e inmune, siendo un regulador crucial de la expresión de ciertos genes y de la actividad de las mitocondrias [30]. Controla procesos como la neurotransmisión [31, 32], el tono vascular por medio de la participación de la guanilato ciclasa soluble (sGC), la transcripción de genes y la traducción de ARN mensajero (ARNm). El  $\bullet\text{NO}$  es sintetizado *in vivo* exclusivamente por las enzimas NOSs y su desregulación puede conducir a situaciones patológicas, sobre todo en el sistema nervioso central [33]. Debido a que el  $\bullet\text{NO}$  no se puede almacenar, la disponibilidad del  $\bullet\text{NO}$  está regulada únicamente a nivel de biosíntesis por las NOSs.

Los mecanismos de acción del  $\bullet\text{NO}$  son numerosos y variados, pero los mejor caracterizados son la activación de la sGC, la regulación de la respiración mitocondrial y la nitrosilación como modificación post-traducciona de proteínas.

**Acción de la guanilato ciclasa** En el músculo liso de las arterias, el aumento de los niveles de  $\bullet\text{NO}$  inducido por estimulación externa produce su asociación al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble, donde probablemente se desplaza la histidina del lado distal y se induce su activación. El cGMP inicia una cascada de señalización que se inicia con la activación de la quinasa PKG, y conduce a la fosforilación de proteínas reguladoras del nivel de calcio intracelular y a la regulación de proteínas del citoesqueleto.

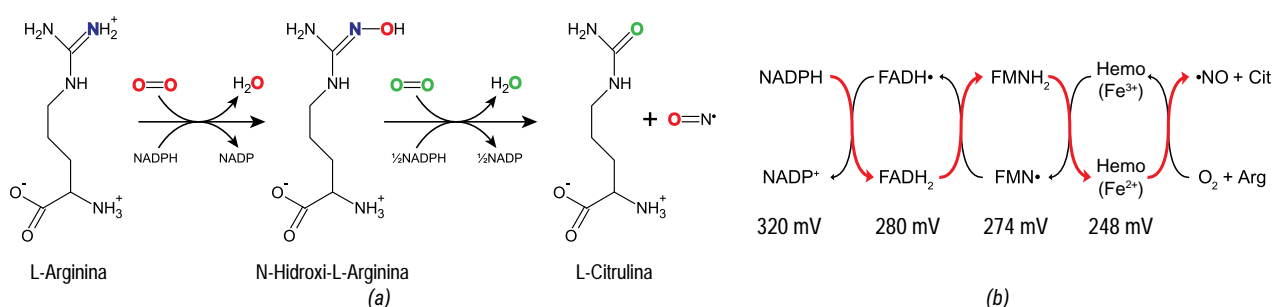
**Efecto en la cadena respiratoria** A concentraciones fisiológicas, el  $\bullet\text{NO}$  inhibe de forma reversible la citocromo C oxidasa [34], el complejo IV de la cadena respiratoria, por competición directa con el oxígeno, mientras que concentraciones mayores pueden inhibir irreversiblemente el complejo I. Esto da lugar a un fenómeno conocido como hipoxia metabólica, en la que, aun existiendo una concentración normal y adecuada de  $\text{O}_2$ , la célula es incapaz de utilizarlo [35].

**Nitrosilación de proteínas** El  $\bullet\text{NO}$  puede producir la S-nitrosilación de residuos de cisteína de las proteínas, una modificación que puede afectar drásticamente su función. Las caspasas, por ejemplo, pueden verse nitrosiladas con un efecto de inhibición de la apoptosis, así como algunos factores de transcripción [36].

**Asociación al grupo hemo** Como molécula señalizadora, debe actuar sobre proteínas sensoras. El  $\bullet\text{NO}$  es capaz de formar enlaces de coordinación con el átomo de hierro de las hemo proteínas, como en la sGC, y se ha descrito recientemente la existencia de receptores nucleares activados por el  $\bullet\text{NO}$  [37].

### 1.3.1. Síntesis del óxido nítrico

Dado que el  $\bullet\text{NO}$  no se puede almacenar, se sintetiza bajo demanda mediante la actividad regulada de las NOSs. El  $\bullet\text{NO}$  se sintetiza a partir de la oxidación de L-arginina (L-Arg), para generar L-citrulina (L-Cit) y el radical  $\bullet\text{NO}$ , utilizando para ello los cosustratos  $\text{O}_2$  y NADPH (Fig. 1.5) [38]. La reacción pasa por el intermediario N-hidroxi-L-arginina (NOHA), y requiere de los cofactores de oxidorreducción (el grupo hemo, el  $\text{BH}_4$  y las flavinas FAD y FMN), así como la función estructural del átomo de zinc tetracoordinado, y la unión de  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Es una reacción compleja, en la que el flujo de electrones transcurre en *trans*, i.e. los electrones adquiridos por el dominio reductasa de un monómero son donados al dominio oxigenasa del otro monómero, razón por la cual el monómero es inactivo [39], y la unión de L-Arg y el  $\text{BH}_4$  promueve la dimerización. La L-Arg capta los electrones en dos reacciones de monooxigenación consecutivas, gracias a que los dos electrones donados por el NADPH son cedidos consecutivamente al grupo hemo, que solo acepta uno cada vez, por medio de intermediarios semiquinonas. El flujo de electrones  $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{FMN}$  es común a todas las di-flavina reductasas, y está dirigido por los potenciales redox, equilibrados termodinámicamente. La acción de la calmodulina tiene un efecto cinético, más que termodinámico, pues no altera estos potenciales redox.



**Figura 1.5:** Reacción de síntesis del óxido nítrico. a) Mecanismo de reacción propuesto para la transferencia de los átomos de oxígeno en pasos sucesivos, desde el agua hasta el óxido nítrico. b) Flujo de los electrones, dirigidos por el potencial redox.

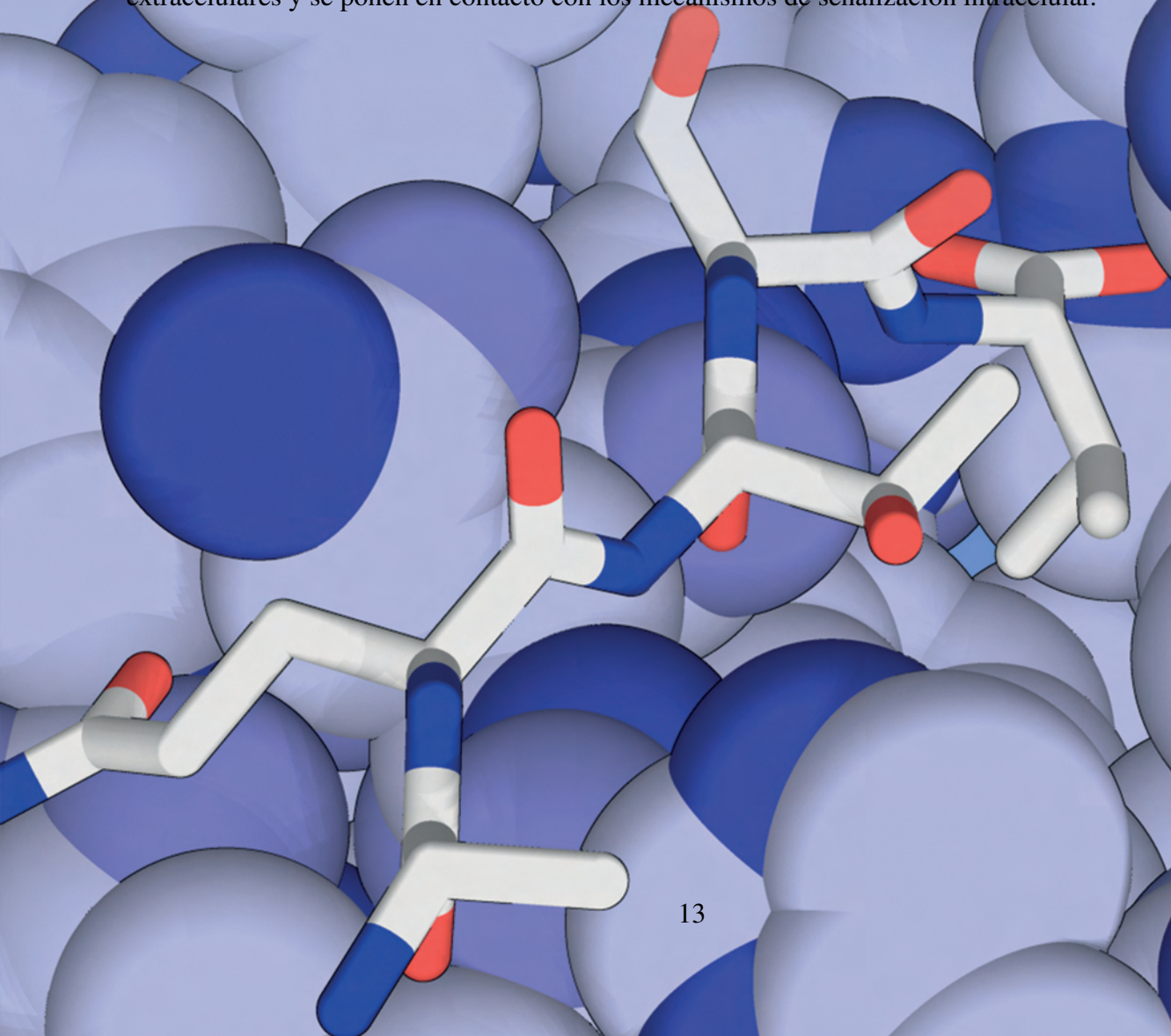


## Capítulo 2

# Los dominios PDZ

### Andamios moleculares

Los dominios PDZ son andamios proteicos dedicados a la formación de grandes complejos moleculares a través de interacciones proteína-proteína. Son dominios modulares que se encuentran típicamente en grandes proteínas multidominio especializadas en la estructuración de estos complejos en regiones concretas de la célula, donde se reclutan proteínas implicadas en la recepción de señales extracelulares y se ponen en contacto con los mecanismos de señalización intracelular.



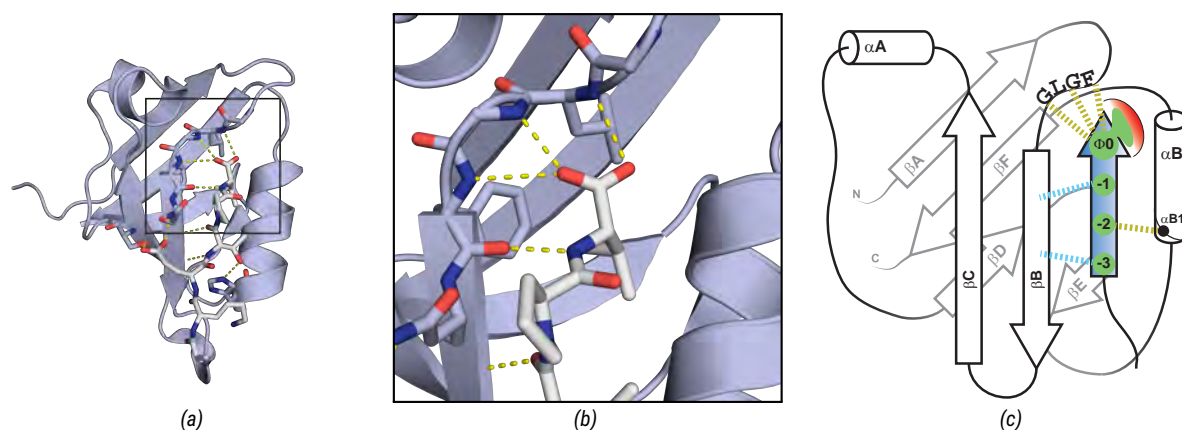


## 2.1. Estructura típica

Los dominios PDZ (PSD-95/Dgl-1/ZO-1) son motivos estructurales para la interacción de proteínas [40, 41]. Se han descrito más de 250 proteínas con dominios PDZ en *H. sapiens*, algunas de ellas con varios módulos en la misma cadena peptídica con casos tan extremos como los 17 módulos de proteína con múltiples dominios PDZ (*Multiple PDZ Protein 1*, MUPP1), y están ampliamente distribuidos desde bacterias a metazoos [42]. En general, todos los dominios PDZ mantienen una estructura global conservada entre los distintos filos.

Los dominios PDZ tienen una función de andamiaje para la formación de grandes complejos proteicos y el control de la localización de proteínas a compartimentos celulares específicos, procesos fundamentales en la coordinación de los sistemas de señalización intracelular. El dominio PDZ típico de metazoos es un módulo globular de unos 90 aminoácidos, con 6 cadenas  $\beta$  y dos hélices  $\alpha$  formando un surco para la interacción del extremo C-terminal de la proteína diana (Fig. 2.1). El ligando se inserta entre la hélice  $\alpha_2$  y la hebra  $\beta_2$ , extendiendo de forma antiparalela la lámina  $\beta$  [40] y formando para ello un conjunto de puentes de hidrógeno típicos. Al plegarse, los extremos Nt y Ct del dominio quedan próximos entre sí, en el extremo opuesto al bolsillo de interacción, quedando como un glóbulo colgando del esqueleto peptídico de la proteína. Entre las cadenas  $\beta_1$  y  $\beta_2$  está el lazo de unión del carboxilato C-terminal con la secuencia -[R/K]xxxGLGF-, una secuencia altamente conservada que definió en sus orígenes la identidad del dominio PDZ y que es clave para establecer la red de puentes de hidrógeno que fijan y estabilizan el péptido entrante, siendo crítica para la interacción de cualquier ligando. Sobre esta estructura general pueden existir variaciones entre los diferentes dominios PDZ que modulan su actividad de interacción mediante extensiones en los extremos Nt y Ct (como la hélice  $\alpha$  en el extremo Ct del PDZ3 de PSD-95 [43]), por interacciones alostéricas con otros dominios de la misma cadena peptídica (homotípica) o de otra accesoria (heterotípica), o por interacciones con fosfolípidos de membrana. Además la interacción puede ser regulada por medio de modificaciones post-traduccionales o conformacionales. Estos mecanismos están bien revisados en la literatura (ver Ye and Zhang [41]).

Los motivos de unión al PDZ (PBM) son, al menos, los 4 últimos residuos del extremo C-terminal de las proteínas que se insertan en forma de hebra antiparalela a la lámina existente en la estructura del dominio PDZ. La secuencia del extremo del ligando determina su especificidad gracias a la presencia en el surco de unas oquedades que reconocen las cadenas laterales de los residuos en las posiciones  $P_0$  y  $P_{-2}$  (siendo la posición 0 el aminoácido en el extremo), a la vez que el grupo carboxilato terminal es estabilizado por el lazo -GLGF-. Aunque estas posiciones son las que determinan la especificidad, recientemente se ha visto que las otras posiciones ( $-1$ ,  $-3$ ,  $-4$  y  $-5$ ) también participan en la selectividad, e incluso algunas secuencias internas también podrían interaccionar con PDZs [18, 44]. Se han establecido tres grupos principales de secuencias de unión a PDZs determinados por las posiciones  $P_0$  y  $P_{-2}$ , aunque es difícil establecer un límite entre ellos, siendo la realidad un continuo modulado por toda la secuencia [45].



**Figura 2.1:** Estructura típica de un dominio PDZ. (a) Representación de la estructura secundaria, a partir del PDZ3 de PSD-95 (PDB ID: 1TP3); (b) Detalle de la posición  $P_0$ , mostrando cómo la cadena lateral del aminoácido se coloca en el bolsillo hidrofóbico, mientras que el grupo carboxilato forma los puentes de hidrógeno con el esqueleto peptídico del lazo -GLGF-; (c) Esquema de una interacción canónica, indicando los puentes de hidrógeno con el lazo -GLGF-, el bolsillo hidrofóbico y el puente de hidrógeno entre la posición -2 y el primer aminoácido de la hélice  $\alpha 2$  ( $\alpha 2-1$ ).

**Tipo I:** Además del aminoácido hidrófobo en el extremo (aminoácido  $P_0$ ), reconocen secuencias con una serina o treonina en  $P_{-2}$ ,  $-X[S/T]X\Phi-COOH$ .

**Tipo II:** Reconocen el aminoácido hidrófobo del extremo y un aminoácido hidrófobo en  $P_{-2}$ :  $-\Phi X\Phi-COOH$ .

**Tipo III:** Más minoritario, también reconocen el residuo hidrófobo en el extremo, y además un ácido en  $P_{-2}$ :  $-X[D/E]X\Phi-COOH$ .

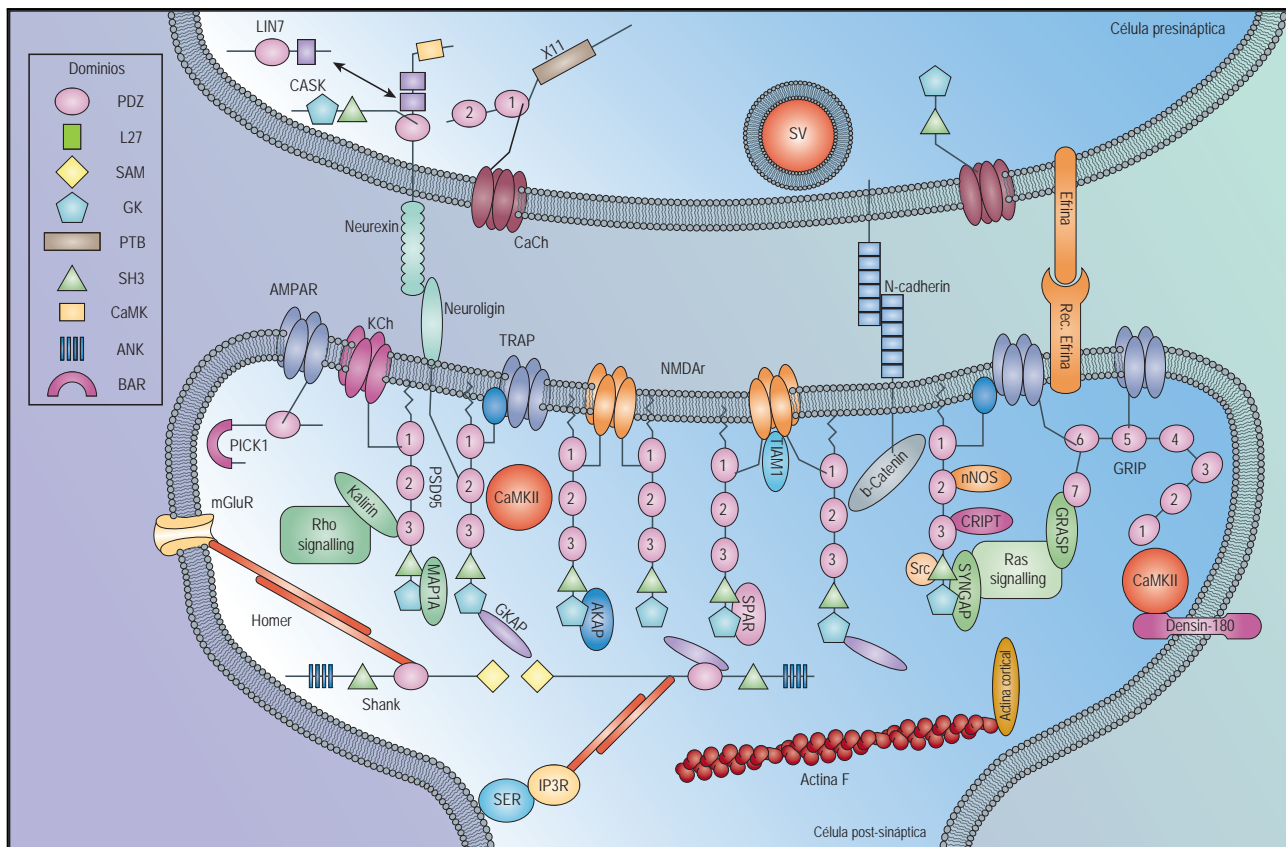
La mayor parte de los dominios PDZ reconocen PBMs de los tipos I y II, mientras que las secuencias de tipo III están escasamente representados, siendo el PDZ de la nNOS el más característico. Esto hace que este dominio PDZ tenga unas propiedades particulares, que serán detalladas más adelante.

### 2.1.1. PSD-95 y la densidad post-sináptica

La densidad post-sináptica es un claro ejemplo de complejos macromoleculares organizados por el ensamblaje de múltiples proteínas de andamiaje. La proteína de la densidad post-sináptica de 95 kDa (*Post-Synaptic Density-95*, PSD-95) es un gran polipéptido muy abundante en la región post-sináptica de las neuronas. Contiene tres dominios PDZ (PDZ1-3), un dominio de homología a Src (SH3) y un dominio de tipo guanilato quinasa. Es una proteína de andamiaje que se distribuye a unos 12 nm por debajo de la membrana y regula la actividad post-sináptica mediante el reclutamiento de las proteínas de señalización, la estructuración de la adhesión sináptica y el control de procesos vesiculares (ver Fig. 2.2 y la muy buena revisión de Kim and Sheng [46]). Interacciona consigo mismo mediante sus extremos N-terminales (cabeza con cabeza), creando una plataforma de reclutamiento que reúne en la misma zona a una gran variedad de componentes post-sinápticos como receptores, canales y enzimas relacionadas con la señalización, incluyendo los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), canales de  $K^+$ , o la proteína rica en residuos de cisteína CRIPT [46].

Quizás la proteína más relevante de las que se unen a PSD-95 es la nNOS, con la que forma





**Figura 2.2:** La densidad post-sináptica es una gran estructura proteica justo por debajo de la membrana post-sináptica, donde se reúnen todos los mecanismos de respuesta y regulación de la sinapsis, siendo la proteína PSD-95 el principal componente de andamiaje. Adaptada de Feng and Zhang [47, Fig. 1]

una interacción a través del dominio PDZ2 de PSD-95 y la horquilla  $\beta$  de la nNOS, modulando de esta manera la síntesis de  $\bullet\text{NO}$  (dependiente de  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) de la respuesta sináptica. PSD-95 actúa de proteína de andamiaje para acercar a la nNOS al receptor de NMDA, donde quedaría colocada adecuadamente para reaccionar ante el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 2.1.2. La distrofina y la unión neuromuscular

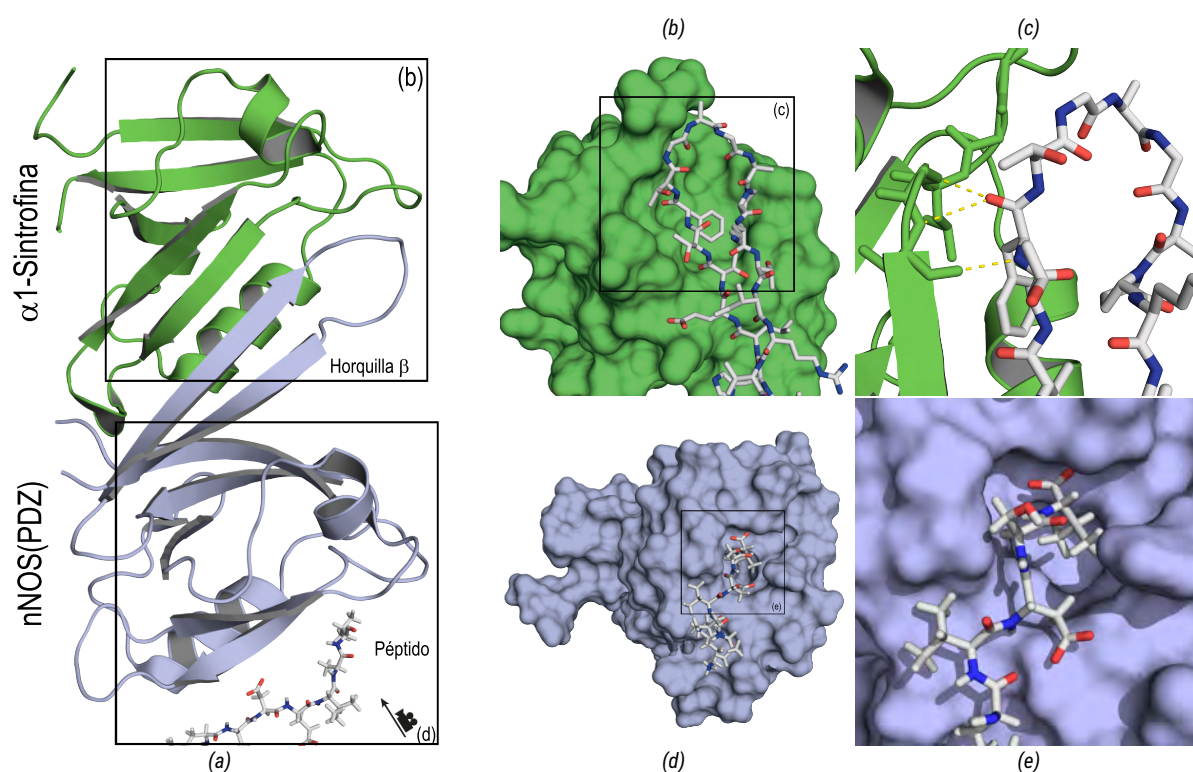
En el músculo la distrofina es una proteína de gran tamaño que tiene 23 repeticiones de tipo espectrina (*Spectrin-Type Repeats*, STR), y sirve para conectar el citoesqueleto al medio extracelular y mantener la integridad del sarcolema durante la contracción muscular. Se localiza bajo la membrana, y contribuye a la formación de los complejos proteicos de respuesta en los puntos de contacto neuromuscular. Es una proteína fundamental, y mutaciones que afectan a la distrofina son las causantes de distrofias musculares, como distrofia muscular de Duchenne (*Duchenne Muscular Dystrophy*, DMD). Entre las proteínas implicadas en este complejo está la nNOS [15] la cual está asociada a la  $\alpha$ 1-sintrofina [16] (Fig 2.4a). Aunque aún no se conoce con exactitud el mecanismo de la interacción entre la distrofina y el complejo  $\alpha$ 1-sintrofina-nNOS se han identificado las STR R16 y R17 como las responsables de la formación de este complejo [19].



## 2.2. El dominio PDZ de la nNOS

Tal y como se ha comentado anteriormente, el dominio PDZ de la óxido nítrico sintasa neuronal es una característica exclusiva de la isoforma neuronal, está presente en su extensión N-terminal y sirve como regulador de la localización intracelular de la enzima para su asociación a complejos proteicos submembranales donde la nNOS pueda responder a los flujos de calcio. Tiene como particularidad una región extra en su región Ct que se pliega en una horquilla  $\beta$  transitoria que se ve estabilizada por la propia dimerización del PDZ y media algunos modos de interacción de este dominio.

La horquilla  $\beta$  del dominio PDZ de la nNOS heterodimeriza específicamente con los dominios PDZ de las proteínas PSD-95 y  $\alpha$ -sintrofina [16], interacción que permite el reclutamiento de la nNOS a los complejos de respuesta celulares para ser integrada en las rutas de señalización intracelular. De esta forma, la interacción con PSD-95 en neuronas permite asociar la activación sináptica del receptor de NMDA a la producción de  $\bullet$ NO, mientras que en las células musculares, la nNOS es reclutada al complejo de la distrofina para conectar el aumento de la tasa metabólica por la contracción muscular con un aumento del flujo sanguíneo mediado por la vasodilatación inducida por  $\bullet$ NO.



**Figura 2.3:** El dominio PDZ de la nNOS. (a) El dominio PDZ de la nNOS tiene la particularidad de la extensión que se pliega en horquilla en su extremo C-terminal, con la que puede interaccionar insertándolo en el sitio canónico de otros dominios PDZ, como el de la  $\alpha$ 1-sintrofina (verde) (PDB ID: 1QAV). En el otro extremo del dominio, mantiene su lado receptor libre para la inserción de un péptido. (b) Detalle del modo de interacción de esta horquilla  $\beta$  en el sitio de la  $\alpha$ 1-sintrofina. (c) Detalle de las interacciones que forma el pseudopéptido de la horquilla  $\beta$ , emulando un extremo C-terminal. El lazo de unión del carboxilato de la  $\alpha$ 1-sintrofina forma los puentes de hidrógeno con el esqueleto peptídico de la horquilla, mientras la Phe se inserta en el bolsillo hidrófobo. (d) La cara receptora, con el surco canónico donde se introduce el extremo C-terminal del ligando. En este caso, el receptor melatonina (PDB ID: 1B8Q).

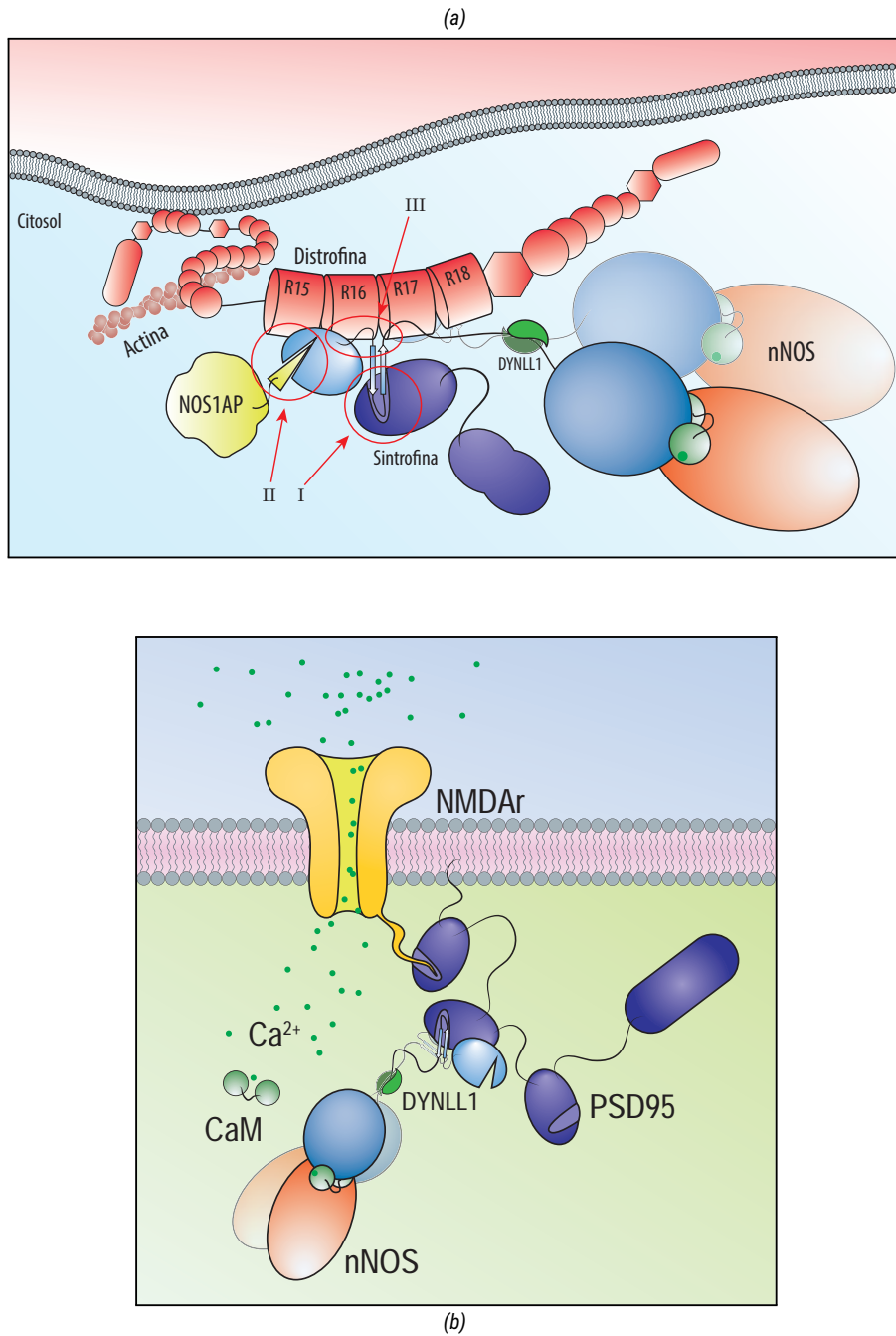
La interacción con estas proteínas es una asociación lateral mediada por la horquilla  $\beta$  [18], que ocupa el sitio canónico del PDZ de la  $\alpha$ -sintrofina o de PSD-95 mediante una secuencia interna a modo de pseudopéptido, que emula un extremo carboxilato mediante un giro muy pronunciado para dejar orientado el esqueleto peptídico y poder enlazarse con el bucle -GLGF- del PDZ receptor. Con este mecanismo, el dominio PDZ de la nNOS sigue teniendo su propio sitio de unión libre para la interacción con otros componentes, permitiendo la formación de complejos supramoleculares estructurados. El dominio PDZ de la nNOS es un ejemplo de la variabilidad que pueden mostrar estos módulos de andamiaje en sus mecanismos de interacción.

Se han propuesto así tres mecanismos para las interacciones del PDZ de la nNOS, que se recogen en la figura 2.4a:

1. Inserción de péptidos C-terminales en el sitio canónico del dominio PDZ [48].
2. Interacción con secuencias internas que mimetizan un extremo C-terminal y se acoplan en el mismo sitio [18].
3. Interacción PDZ-PDZ, por reconocimiento de la horquilla  $\beta$  de la nNOS [18, 49], una secuencia interna que mimetiza un extremo C-terminal.
4. Interacción, por un mecanismo aún desconocido, de las repeticiones de espectrina (R16 y R17) de la proteína distrofina. En realidad no está claro si efectivamente participa el dominio PDZ o intervienen otras regiones cercanas.

El PDZ de la nNOS reconoce secuencias C-terminales muy variadas. Es uno de los pocos dominios PDZ que reconoce secuencias de tipo III [40], pero entre sus ligandos celulares hay secuencias de todos los tipos. Poco a poco se han identificado otros dominios PDZ capaces de reconocer estos PBMs, como el PDZ3 de la proteína ZO1 [62] o el PDZ10 de MUPP1 [63], pero la información estructural existente es muy escasa. de hecho, sólo se ha obtenido una estructura tridimensional del dominio PDZ con un ligando, el extremo C-terminal del receptor de melatonina [52]. En la tabla 2.1 se reúnen las proteínas descritas que interaccionan con el dominio PDZ de la nNOS, son secuencias C-terminales, en las que el extremo carboxilo terminal se inserta de la forma habitual en el bolsillo del PDZ.

En definitiva, el PDZ de la nNOS es extraño entre los dominios PDZ, porque tiene una alta variabilidad en sus modos de interacción y en las secuencias que reconoce y no ha sido posible determinar las bases moleculares que controlan la unión de un conjunto tan diverso de secuencias, lo que dificulta la definición los requerimientos precisos para las interacciones de este dominio. Conocer estos requerimientos puede ayudar en la identificación de nuevas dianas, que podrían permitir profundizar en los mecanismos de regulación de la nNOS, tanto en condiciones fisiológicas como en patologías.



**Figura 2.4:** (a) Asociación de la nNOS al sarcolema. En el músculo esquelético, de forma similar a la densidad post-sináptica, la nNOS forma parte de un gran complejo, estructurado bajo la el sarcolema y que si se altera produce varias distrofias, entre ellas la DMD. Según el modelo prevalente, la nNOS es reclutada al sarcolema gracias a la sintrofina, con la que interacciona a través de la horquilla  $\beta$  (I), mientras el bolsillo canónico está ocupado por NOS1AP (II), y contacta con las repeticiones de espectrina R16 y R17 de la distrofina (III) por un mecanismo aún desconocido. (b) Asociación de la nNOS en la densidad post-sináptica, donde queda localizada en las proximidades del receptor de NMDA gracias a la proteína PSD-95, para responder al flujo de calcio tras la activación del receptor.

##	Proteína	Especie (Uniprot ID)	Secuencia	Tipo PBM	Interacción	Refs
1.	Bredt44	Librería	-LARLNLSSYYGDAV*	Tipo III	Extremo Ct	[50]
2.	Bredt123	Librería	-LDRLNRVHGDV*	Tipo III	Extremo Ct	[50]
3.	Bredt161	Librería	-VIGKSCYGDAV*	Tipo III	Extremo Ct	[50]
4.	R. Adren. $\alpha$ 1A	<i>H. sapiens</i> (P35348)	-KITHITISLGENGEEV*	Tipo III	Extremo Ct	[48]
5.	NOS1AP	<i>H. sapiens</i> (O75052)	-RQELFDSLDEIAV*	Tipo II	Extremo Ct	[51]
6.	R. Melat.	<i>H. sapiens</i> (P48039)	-PLITNNLIKVDVSV*	Tipo III	Extremo Ct	[52]
7.	PFK-M	<i>R. norvegicus</i> (P47858)	-LEHISRKRSGEAAV*	Tipo II	Extremo Ct	[53]
8.	ICA-512	<i>H. sapiens</i> (Q16849)	-SHPNSPLQSQETPV*	Tipo I	Extremo Ct	[54]
9.	R. Serot. 2B	<i>H. sapiens</i> (P41595)	-ENDGDKVEDQVSYI*	Tipo I	Extremo Ct	[55]
10.	PMCA-4b	<i>H. sapiens</i> (A1X4Q1)	-PQSDSSLQSLETSV*	Tipo I	Extremo Ct	[56]
11.	CtBP	<i>R. norvegicus</i> (Q9Z2F5)	-VKPEADRDHASDQL*	Tipo III	Extremo Ct	[57]
12.	NIDD	<i>R. norvegicus</i> (Q76IC6)	-LGTRTVHTPAEDIV*	Tipo III	Extremo Ct	[58]
13.	Cit. C ox.		-LGISTPEELGLDKV*	Tipo III	Extremo Ct	[59]
14.	Vac14	<i>H. sapiens</i> (Q08AM6)	-RSGRGDHLDRRVVL*	Tipo II	Extremo Ct	[60]
15.	Vac14	—	—	—	Secuencia interna	[60]
16.	T. Serot.		-PTEIPCGDIRMNAV*	—	Extremo Ct	[61]
17.	Nav1.4	<i>M. musculus</i> (Q9ER60)	-QGQTVRPGVKESLV*	I	Extremo Ct	[45]
18.	Claudin 3	<i>M. musculus</i> (Q9Z0G9)	-GTGTGTAYDRKDYV*	III	Extremo Ct	[45]
19.	Claudin 14	<i>M. musculus</i> (Q9Z0S3)	-TSAAHSGYRLNDYV*	III	Extremo Ct	[45]
20.	PSD-95			—	Horquilla $\beta$	[16, 49]
21.	$\alpha$ -Sintrofina			—	Horquilla $\beta$	[18]
22.	Distrofina			—	STR 16 y 17	[19]

**Tabla 2.1:** Recopilación de las proteínas que se han descrito que interaccionan con el PDZ de la nNOS. Los ligandos que se unen al PDZ insertando el extremo C-terminales pueden englobarse casi todos en uno de los tres tipos de motivos de unión al PDZ descritos, pero hay algunos cuya secuencia se desvía bastante de la establecidas. STR, repeticiones de tipo espectral (*spectrin-type repeats*).



## Capítulo 3

# Las Dineínas

### Tracción microtubular

Las dineínas (*dyneins*) son grandes complejos moleculares, responsables del transporte de cargamentos celulares hacia el extremo negativo de los microtúbulos, de forma dependiente de ATP. Se descubrieron en los años 60, y desde entonces no han dejado de dar sorpresas. Su gran tamaño y compleja composición han hecho difícil su estudio, y a pesar de los esfuerzos, sólo recientemente se han ido obteniendo las estructuras cristalográficas, y junto a los trabajos con molécula única que han permitido ir arrojando luz sobre sus mecanismos motores.





### 3.1. Dineínas vs otros motores

Hay tres motores moleculares en las células, que no son homólogos y han evolucionado independientemente: las miosinas, las kinesinas y las dineínas. Las miosinas son las responsables de la contracción muscular, y ejercen su fuerza sobre el citoesqueleto de actina. Las kinesinas y dineínas actúan sobre los microtúbulos, pero en sentidos opuestos y son completamente diferentes en cuanto a su estructura [64].

Comparten entre sí varias características relacionadas con la actividad motora.

1. En todos los casos utilizan los caminos proporcionados por el citoesqueleto para realizar el trabajo;
2. Son ATPasas, que transforman la hidrólisis del ATP en fuerza mecánica, traduciendo el consumo de una molécula de ATP en el movimiento de un paso por el citoesqueleto;
3. Son complejos multiméricos, en los que las cadenas pesadas contienen las actividades ATPasa y unión al citoesqueleto. Las funciones específicas de cada miembro, su modulación y su regulación vienen otorgadas por las proteínas accesorias;
4. En su estructura, una cabeza globular contiene la actividad ATPasa y la región sensible al ATP y de unión al citoesqueleto, mientras que una larga cola extendida permite su interacción con las demás subunidades.

Miosinas y kinesinas no comparten su camino evolutivo, pero son mucho más similares entre sí que con las dineínas. A pesar de la falta de homología de secuencia, miosinas y kinesinas tienen una estructura similar, y un mecanismo para la generación de fuerza. La unión e hidrólisis del ATP produce pequeños cambios conformacionales que son amplificadas en la región cuello, que conecta la cabeza con la cola. La unión del ATP produce un balanceo de la cabeza sobre el cuello. La hidrólisis del ATP y liberación del ADP y/o el fosfato hace que la cabeza recupere su afinidad por el citoesqueleto, se una, y vuelva a recuperar la conformación contraída para producir el movimiento. Por el contrario, las dineínas son proteínas mucho más grandes, en donde la cadena pesada contiene una cabeza globular enorme con hasta seis posibles sitios de unión del ATP, y el mecanismo motor es radicalmente diferente, que será descrito más adelante.

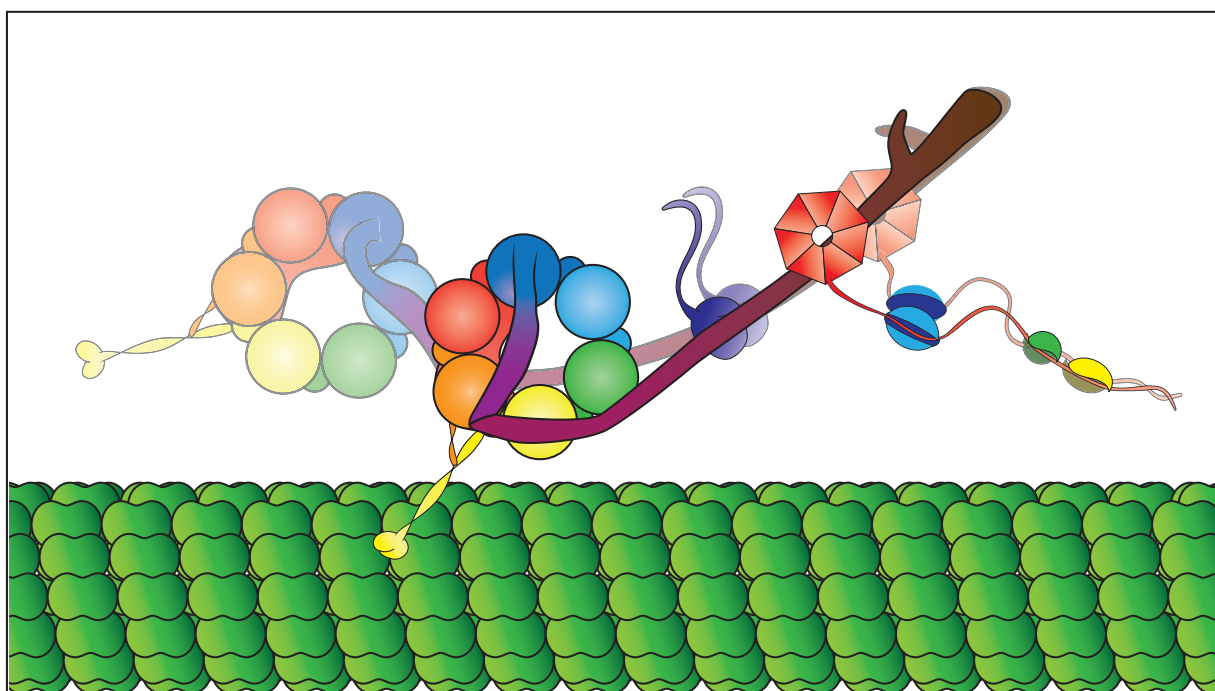
Las funciones de los diferentes motores, lejos de estar diferenciadas, están íntimamente relacionadas entre sí. Las miosinas no sólo producen la contracción muscular, también pueden transportar orgánulos; las kinesinas, además del transporte vesicular, son necesarias en la función ciliar y también pueden translocarse en sentido negativo; y las dineínas participan en muchos más procesos más allá del movimiento ciliar.

### 3.2. Las Dineínas: Aspectos generales

Las dineínas son grandes complejos que fueron descritos como ATPasas (Fig. 3.1). La familia de las dineínas es muy numerosa, y se clasifica en base a sus cadenas pesadas, su evolución filogenética



y su composición en subunidades. Se han descrito dos tipos de dineínas citoplasmáticas [65], y numerosos miembros de las dineínas flagelares [66, 67]. Comparten entre sí el hecho de que son un gran complejo compuesto por múltiples subunidades y proteínas accesorias. Cada tipo de dineína tiene una composición en subunidades diferente, muchas de las cuales son exclusivas, aunque otras pueden ser comunes a otras dineínas o incluso a otros complejos celulares. La variedad de subunidades es amplia, existiendo varios genes para cada tipo, y versiones que aparecen por procesamiento alternativo, permitiendo definir numerosos tipos diferentes de dineínas, que exhiben un patrón de expresión diferencial para ensamblar diferentes tipos de dineínas según los tejidos para las funciones específicas [65].



**Figura 3.1:** La dineína es un gran complejo molecular que «camina» por los microtúbulos hacia el polo negativo. Coordina los ciclos de hidrólisis del ATP con la afinidad al microtúbulo a través de un complejo mecanismo de interacciones intramoleculares para convertir la energía química del nucleótido en energía mecánica y fuerza de movimiento. Aquí se representa un dímero de dineína citoplasmática, una en un estado de alta afinidad por el microtúbulo, y la otra en su estado libre, lista para dar un paso.

Varios organismos se han utilizado ampliamente como modelos para estudio de las dineínas. Entre otros, el ciliado *Tetrahymena thermophila* y el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* proporcionaron una gran cantidad de datos, gracias a su abundancia en componentes flagelares. La ameba *Dyctiostelium discoideum* y las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* permitieron profundizar en las funciones citoplasmáticas de la dineína, y la mosca *Drosophila melanogaster* y mamíferos como *Mus musculus* dieron la opción de hacer estudios genéticos, y determinar los efectos deletéreos de los diferentes componentes de las dineínas. En *Homo sapiens* cobran especial interés por su implicación en un conjunto de enfermedades conocidas como ciliopatías, como

la diskinesia muscular o la rara *situs inversus*. Cabe destacar que las plantas superiores carecen de cualquier forma de dineína [68].

La nomenclatura de las diferentes subunidades de las dineínas es compleja y variada. Para las dineínas citoplasmáticas se ha establecido un consenso para nombrar los genes según el estándar de ratón y de humanos, seguido de la subunidad y asignando números consecutivos a los diferentes genes [69].

**Las cadenas pesadas (HCs)** son las subunidades motoras de las dineínas. Catalizan la hidrólisis del ATP y la acoplan directamente a la generación de fuerza motriz, definen la identidad de la dineína y sirven de bastidor principal para el ensamblaje de todo el complejo. Son proteínas de más de 4000 aminoácidos que se distribuyen en dos dominios principales, una cola Nt que tiene las funciones de andamiaje para el montaje de la estructura y asociación a los complejos accesorios, y una cabeza globular que contiene la actividad enzimática y mecánica. Numerosos genes codifican para las diferentes cadenas pesadas que definen los tipos de dineínas, y varían en número y distribución según las especies. Salvando las diferencias entre ellas, las características estructurales y funcionales de las cadenas pesadas están muy conservadas entre las dineínas flagelares y las dos citoplasmáticas. Por ello, los datos que se obtienen en los estudios con las diferentes dineínas se integran y se pueden aplicar a todos los tipos de dineínas. Una descripción detallada de la estructura y la generación de la fuerza motora se realizará en la sección 3.5.

**Las cadenas intermedias (ICs)** son subunidades presentes en las dineínas diméricas, como las flagelares y las citoplasmáticas, pero están ausentes en las dineínas internas monoméricas. En el extremo C-terminal contienen repeticiones WD40 por las que se asocian a las cadenas pesadas, mientras que el extremo N-terminal es una región extendida de longitud variable, y es el lugar de asociación para las demás subunidades, como el complejo de la dinactina y de las cadenas ligeras en las dineínas citoplasmáticas [70]. En la sección 3.6 se procederá a describir su estructura y función.

**Las cadenas intermedias-ligeras (LICs)** son subunidades exclusivas de las dineínas citoplasmáticas. Son polipéptidos de unos 50 a 60 kDa pertenecientes a la familia de las GTPasas. Su asociación a proteínas del centrosoma le dan un papel directo en la migración nuclear o la formación del huso mitótico, además de contribuir al ensamblaje del motor, y al aumento de su repertorio de transporte. Se detallarán algo más en la sección 3.7.

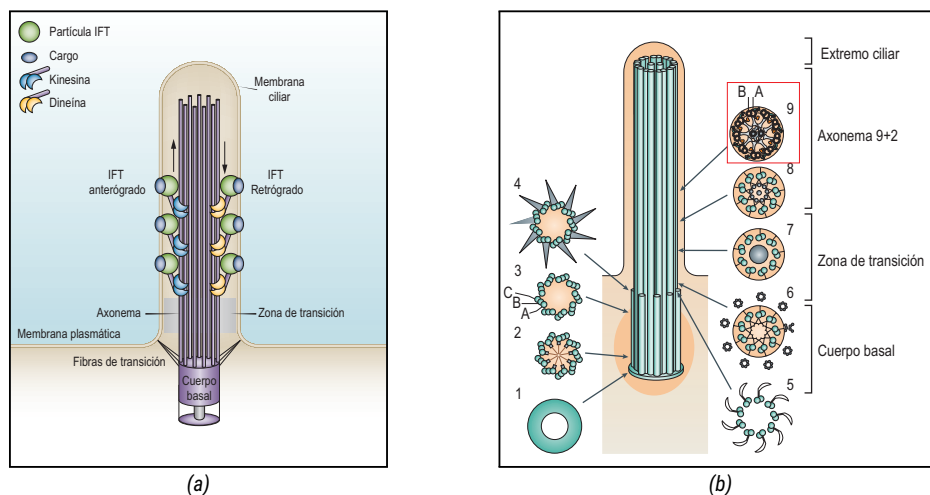
**Las cadenas ligeras (LCs)** son un conjunto de pequeñas proteínas globulares que participan principalmente en el ensamblaje de las dineínas, aunque no se descarta su participación en procesos de asociación al cargamento. En las dineínas citoplasmáticas hay tres familias de cadenas ligeras (DYNLL, DYNLT y DYNLRB) con dos genes cada una, que se asocian al dominio Nt de las cadenas intermedias en forma de homodímeros, en posiciones consecutivas y no solapantes. Los estudios iniciales en

las cadenas ligeras (LCs), y el descubrimiento de que son capaces de interaccionar con otras proteínas celulares permitió desarrollar la hipótesis de que las LCs actuarían como adaptadores para asociar proteínas y complejos a las dineínas para su transporte por el microtúbulo [71]. Sin embargo, los estudios estructurales posteriores no ratifican esta idea, pues la cadena intermedia ocuparía el mismo sitio que las otras proteínas [72]. Así, las funciones exactas de las LCs permanecen sin identificar, son un campo de investigación activa, y son el objeto de estudio de una parte de esta Tesis. Un análisis exhaustivo de las cadenas ligeras se realiza en el capítulo 4.

### 3.3. Las dineínas del axonema

#### 3.3.1. Los cilios y el axonema

Los cilios y los flagelos de eucariotas (Fig. 3.2) son orgánulos celulares muy especializados, encargados de producir el movimiento de las células eucariotas, o de generar flujo en un fluido. Los flagelos son largos y mantienen un movimiento ondulado uniforme en toda su longitud, mientras que los cilios son más cortos y tienen un movimiento en dos fases diferenciadas: batido y recuperación. Es un apéndice rodeado de membrana que se prolonga desde la superficie celular a partir de un cuerpo basal del cual se extiende el axonema, una organización del citoesqueleto altamente especializada, que recorre axialmente el interior de los cilios y flagelos.



**Figura 3.2:** El cilio eucariota. Ensamblado a partir del cilio primario con la participación del transporte intraflagelar (*IntraFlagellar Transport*, IFT), media movimientos celulares, respuestas al entorno o generación de flujos. (a) El cilio primario es un importante centro de integración de estímulos extracelulares para mediar una respuesta intracelular. Adaptada de Valente et al. [73, Fig. 1]. (b) El cilio móvil es una estructura en la que los microtúbulos se deslizan entre sí por acción de las dineínas del axonema. Adaptada de Fliegauf et al. [74, Fig. 1]

Típicamente está formado por un par de microtúbulos centrales, rodeado por nueve dobletes de microtúbulos periféricos, en los que un microtúbulo A es pequeño pero está completo, y un microtúbulo B ha perdido tres protofilamentos que se completan al apoyarse sobre el microtúbulo A de

manera oblicua, estando más alejado del centro. Esta organización se conoce tradicionalmente como estructura 9+2, y está muy conservada en todos los linajes eucariotas. Los microtúbulos periféricos están conectados entre sí por la proteína nexina, que enlaza el microtúbulo A con el B del siguiente doblete, y el microtúbulo A se comunica con los microtúbulos centrales por las espículas radiales. Para generar el movimiento, los microtúbulos periféricos se deslizan uno sobre el otro gracias a las dineínas que se distribuyen a lo largo de su longitud. Por otra parte, el cilio primario es un apéndice inmóvil, con estructura 9+0, que participa en diversos sistemas de señalización, y carece de los brazos de dineínas. En todos los casos, los cilios se ensamblan a partir de una región en la superficie celular denominada cuerpo basal, con una estructura microtubular de 9x3+0 y que sirve como centro de nucleación para los microtúbulos del axonema.

Las dineínas del axonema son un conjunto variado y complejo de miembros. Se definen dos grandes grupos funcionales [67, 75, 76], que se distribuyen en dos filas regulares a lo largo del axonema: las dineínas del brazo externo (OADs) y las dineínas del brazo interno (IADs), con numerosas proteínas accesorias asociadas para configurar la estructura y función del axonema.

### 3.4. Las dineínas citoplasmáticas

Las dineínas citoplasmáticas son el motor que realiza todo el transporte retrógrado de la célula. Sus funciones son muchas y variadas: transporte de vesículas entre diferentes compartimentos (endosomas tempranos a tardíos [77, 78], aparato de Golgi al retículo endoplasmático [79], endosomas al sistema trans-Golgi (*Trans-Golgi Network*, TGN)[80]), organización de orgánulos [81–83], transporte retrógrado por el axón de las neuronas [84], migración nuclear y celular [85–88], control de la arquitectura del citoesqueleto [89], y especialmente en diversos aspectos de la mitosis [90–93], como el anclaje de los microtúbulos al cinetócoro [94], la orientación del uso mitótico [95–97], la disgregación del núcleo o la citocinesis [98]. Por otro lado, un segundo tipo de dineína citoplasmática es la responsable del transporte intraflagelar durante el ensamblaje y mantenimiento de los cilios [99–102]. Más allá de las funciones celulares, las dineínas, junto a otros motores moleculares, son utilizadas por los virus durante su ciclo infeccioso, para su transporte intracelular [103, 104] (Fig. 4.15).

Cómo una única dineína citoplasmática es capaz de llevar a cabo una variedad tan alta de funciones ha sido siempre un campo importante de investigación. Como se ha descrito anteriormente, las cadenas pesadas de las dineínas citoplasmáticas se asocian a un conjunto de subunidades que, según su tamaño, han sido clasificadas en cadenas intermedias ( $\approx 74$  kDa), intermedias ligeras ( $\approx 50$  kDa) y ligeras (entre 8 y 15 kDa). Salvo para las cadenas pesadas, de las que sólo hay un gen, todas las demás subunidades están codificadas por dos o más genes, que pueden sufrir un procesamiento alternativo, o incluso modificaciones post-traduccionales para generar una amplia variedad en el ensamblaje de las dineínas que podría cumplir con sus múltiples funciones. Además una serie de complejos accesorios como la dinactina ( $\approx 1$  MDa) [105], Lis1/NudE/NudEL [106] o Rod/Zw10/Zwilch (RZZ) [107]. Estos complejos accesorios actuarían como adaptadores de vesículas y orgánulos y como reguladores de su

actividad, y permitirían aumentar aun más su funcionalidad [108].

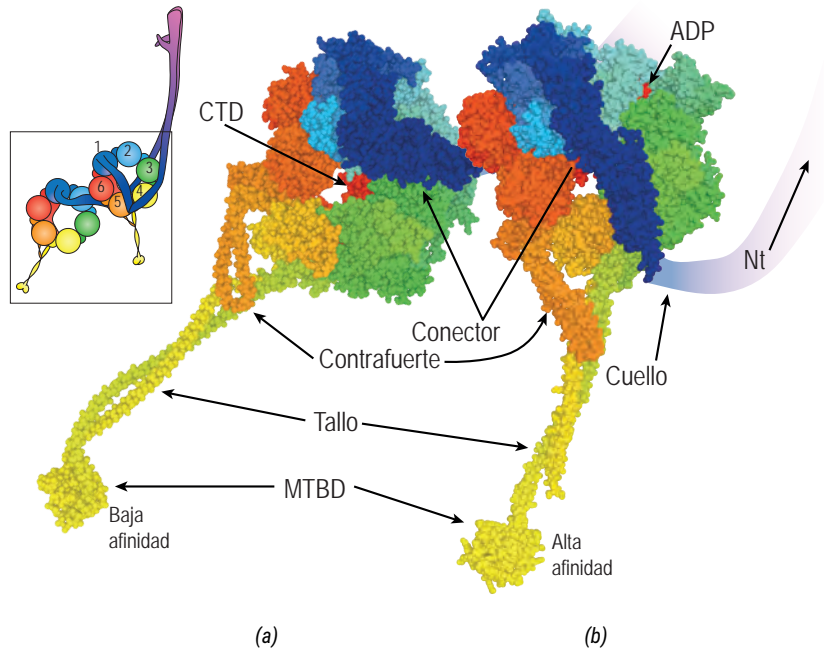
La extracción de las dineínas citoplasmáticas con yoduro potásico (KI) y centrifugación en gradiente de celulosa permite obtener dos grandes subcomplejos, uno que contiene a las cadenas pesadas con las intermedio-ligeras, y otro con las cadenas intermedias y las ligeras [71, 109]. Se han podido identificar diferentes subconjuntos compuestos por diferentes de subunidades, que en última instancia pueden definir las diferentes poblaciones de dineínas [110]. Por ejemplo, las dos cadenas intermedias-ligeras de dineína (LICs) se distribuyen de forma diferente en la célula. Así, durante la mitosis, LIC1 se asocia a la pericentrina en la zona central del huso mitótico, pero LIC2 se localiza en los polos del huso [111], mientras que en la interfase, LIC1 y 2 participan en el reclutamiento de la dineína al aparato de Golgi y endosomas, respectivamente. Lo mismo ocurre con las cadenas intermedias. La isoforma IC1 es específica de neuronas, y está implicada en el transporte de vesículas a través de su interacción con TrkB, siendo la IC2 mucho más ubicua e inespecífica [112]. Aunque su expresión pueda verse compartida en las neuronas, IC1 e IC2 también se encargan de funciones excluyentes, como el reclutamiento a los dos tipos de transporte anterógrado por el axón mediados por las kinesinas [84]. Por otra parte, las isoformas de las LCs de la familia DYNLT se asocian de forma excluyente a la cadena intermedia. Las dineínas con DYNLT1 participan en el transporte de la rodopsina en las células fotorreceptoras, mientras que su homólogo DYNLT3 no lo hace [113], teniendo éste un papel más relacionado con la mitosis [114].

### 3.5. La cadena pesada

La cadena pesada de las dineínas es la subunidad principal. Existe un único gen para cada una de las dineínas citoplasmáticas, *DYNC1H* y *DYNC2H*. Codifican polipéptidos de unos 530 kDa que tienen dos grandes regiones identificables, una cola N-terminal, dedicada al ensamblaje y asociación a las proteínas accesorias, y una cabeza globular que contiene la actividad motora, cuya estructura anular y actividad ATPasa incluye a las cadenas pesadas (HCs) en la familia de ATPasas asociadas a varias actividades celulares (AAA<sup>+</sup>) con la que comparte muchas características [115]. De este dominio globular se extiende un tallo helicoidal que contiene en su extremo el dominio de unión al microtúbulo (*Microtubule Binding Domain*, MTBD). La actividad motora recae en el anillo AAA<sup>+</sup>, y la cadena pesada es autónoma y suficiente para generar movimiento y translocarse por los microtúbulos, pero requieren específicamente al resto de las subunidades y de complejos accesorios para una función efectiva *in vivo* (Fig. 3.3).

### 3.6. Las cadenas intermedias

Las cadenas intermedias (ICs) son un componente esencial de las dineínas. Tanto las flagelares como las citoplasmáticas tienen ICs, aunque con genes exclusivos para cada tipo. En vertebrados hay dos genes para la dineína citoplasmática (*DYNCH1/2*), que mediante procesamientos alternativos del

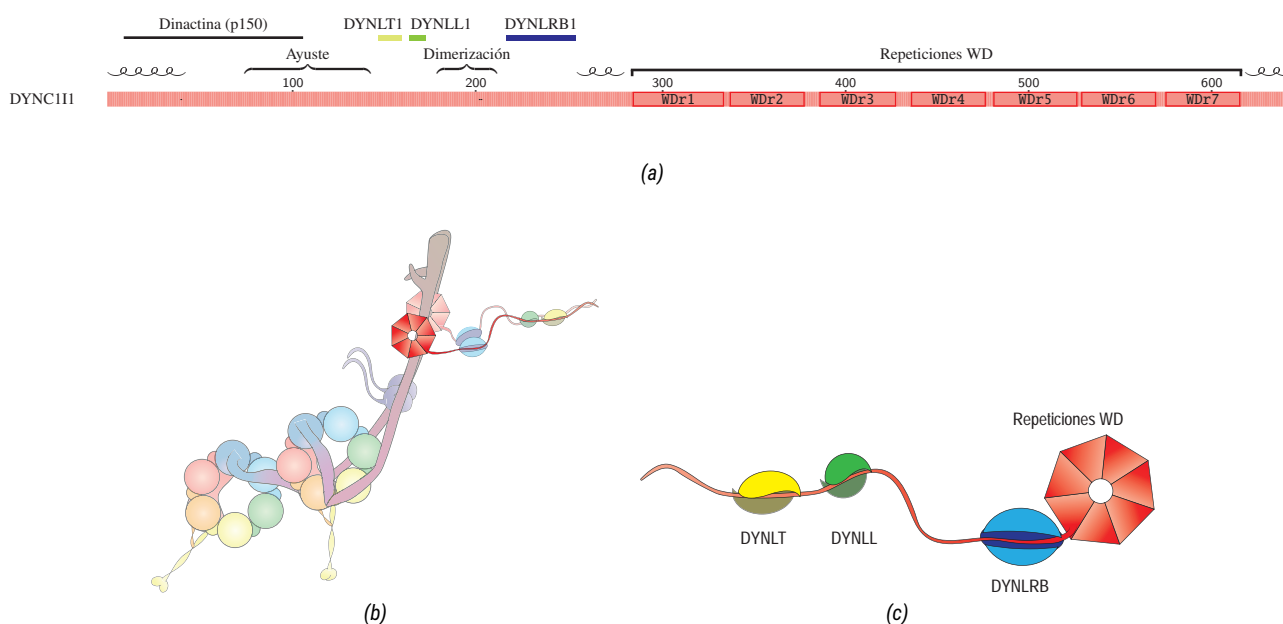


**Figura 3.3:** La cadena pesada de las dineínas es la subunidad motora. La obtención de las estructuras cristalográficas del dominio globular en diferentes estados conformacionales han permitido definir el ciclo motor según el curso de la hidrólisis del ATP. En esta figura se representan los dominios globulares en dos conformaciones: (a) conformación cebada (*pre-powerstroke*), suelta del microtúbulo y lista para un ciclo de hidrólisis [116, PDB ID: 4RH7] y (b) con ADP unido, después de haber liberado el fosfato inorgánico, en una conformación relajada (*post-powerstroke*) y unido al microtúbulo [117, PDB ID: 3VKH], y se ha montado a partir de las coordenadas del PDB.

ARNm pueden generar múltiples isoformas específicas de células y tejido [118, 119], de etapa del desarrollo [69, 120, 121], e incluso específicas de regiones subcelulares [122]. Hay una gran variabilidad en cuanto al número de isoformas de cada gen en diferentes organismos. Así, se han descrito tres variantes para cada uno de los genes en rata (*R. norvegicus*) y *H. sapiens* [122, 123], mientras que en *M. musculus* se detectan hasta seis isoformas [119], y más de diez para el único gen (*Cdic*) de la mosca *D. melanogaster* [124]. En todos los casos, las isoformas A (IC1A e IC2A) corresponden a la proteína más larga. Las isoformas de DYNC1I2 son ubicuas, mientras que DYNC1I1 están más restringidas a tejidos neuronales [120, 122], y la isoforma 2C suele ser la única encontrada en la mayoría de las células de cultivo.

Son proteínas de unos 70 kDa, que tienen un papel fundamentalmente estructural en las dineínas, sirviendo de armazón para el ensamblaje de todo el complejo. De hecho, probablemente tengan un papel esencial, pues su supresión en *D. melanogaster* es letal. El tratamiento de las dineínas con agentes caotrópicos induce su disociación en dos subconjuntos [71], uno con las HCs y LICs y otro con las ICs y LCs evidenciando los dos bloques estructurales. El dímero de cadenas intermedias, estabilizado con las cadenas ligeras, es la plataforma para la asociación de las cadenas pesadas y para los complejos accesorios que amplían la versatilidad de las dineínas, como la dinactina (Fig. 3.4).

La variedad de isoformas de las DIC se restringe al dominio Nt de la proteína, puede definir diferentes subpoblaciones de dineínas para las funciones específicas, y son capaces de formar todas



**Figura 3.4:** Estructura de la cadena intermedia de las dineínas. a) Comparación de la estructura secundaria de los genes humanos de cadenas intermedias. Se indican los sitios de unión de la dinactina (en la región helicoidal del extremo N-terminal), y de las cadenas ligeras DYNLT1 (amarillo), DYNLL1 (verde) y DYNLRB1 (azul), así como el dominio C-terminal de repeticiones WD, que es además el sitio de interacción con las cadenas pesadas. b) Posición de la cadena intermedia en el conjunto de la dineína. c) La cadena intermedia de las dineínas.

las combinaciones de homo y heterodímeros [125], a pesar de lo cual pueden seguir asociándose a los homodímeros de cadenas ligeras [126]. Esto podría favorecer la diferenciación de funciones, como dirigir la asociación a diferentes cargamentos, o aplicar distintos modos de regulación a las dineínas. Así, la isoforma 1B está asociada con el transporte de vesículas que contienen el receptor TrkB [112], mientras que la isoforma 2 dirige la asociación de las dineínas a las adhesiones focales y está implicada en el recambio proteico de algunos de sus componentes [127].

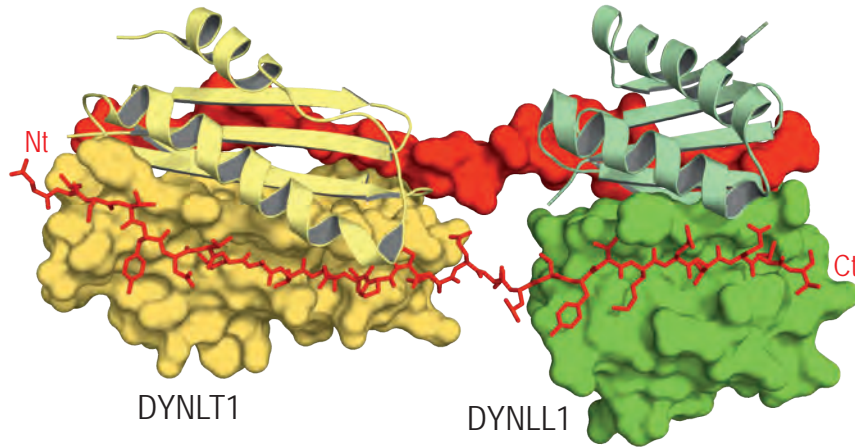
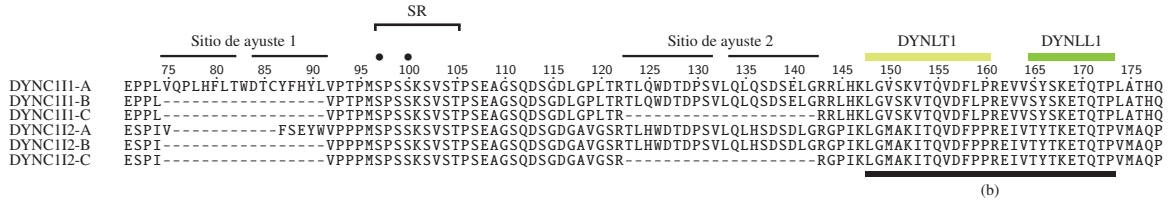
Su estructura se distribuye en un dominio Nt que contiene los sitios de unión para las cadenas ligeras y un dominio C-terminal con siete repeticiones WD40 que se pliegan en conformación de propulsor  $\beta$  ( $\beta$ -propeller).

### 3.6.1. El dominio Nt

El primer tercio de la DIC es una región extendida y desordenada. En el extremo inicial se predice una tendencia a formar una hélice superenrollada inducida por su propia dimerización. Justo a continuación, se encuentra un pequeño segmento rico en serinas y prolinas, altamente desestructurado, que constituye una importante región para la fosforilación de la proteína, y es donde se localizan en ambos genes los puntos de procesamiento alternativo para generar las isoformas más cortas. Seguidamente, los sitios de unión de las cadenas ligeras (DYNLT y DYNLL) se identifican inmersas en esta región desestructurada. La cadena ligera DYNLRB/Roadblock, sin embargo, interacciona hacia el final de este primer dominio, a continuación de una región de residuos ácidos, algo más estructurada, próximo al



comienzo del dominio C-terminal y solapando con una secuencia implicada en la dimerización de la DIC[125] (Fig. 3.5).



**Figura 3.5:** (a) Alineamiento de las isoformas de la cadena intermedia de *H. sapiens*, en la región que sufre el procesamiento alternativo, señalando la región rica en serinas (SR) con los posibles sitios de fosforilación (●) e incluyendo los sitios de unión de DYNLT1 y DYNLL1 DLC8. (b) Representación tridimensional de la formación del complejo triple entre un dímero de cada cadena ligera (● DYNLT1) y (● DYNLL) y la cadena intermedia (●) insertándose a cada lado.

En su dominio N-terminal, la combinación de una alta proporción residuos cargados con poca presencia hidrófoba minimiza la tendencia de un plegamiento dirigido por colapso hidrofóbico, favoreciendo un estado intrínsecamente desordenado [128], que se conserva entre las diferentes especies a pesar de la ausencia de identidad en sus secuencias [129], y constituye una de las proteínas intrínsecamente desordenadas mejor estudiadas. Esta zona contiene los sitios de unión de las LCs DYNLT1 y DYNLL1, cuya interacción induce un cierto ordenamiento de toda la región.

En ausencia de las cadenas ligeras, puede detectarse una cierta predisposición a establecer una estructura helicoidal en dos segmentos, uno al principio y otro cercano al dominio C-terminal, alejados del sitio de unión de las LCs. Constituyen lugares que favorecen la auto-asociación de las ICs, y adquieren una estructura en hélice superenrollada y dimérica tras la adición de las cadenas ligeras [130]. Además, los sitios de interacción de DYNLT1 y DYNLL1 adquieren una estructura extendida al insertarse en los surcos de las LCs [129]. Esta conformación desordenada favorece las funciones de andamiaje de la DIC. El estado desordenado implica una pérdida de afinidad de interacción a las LCs debido a la carga entrópica que conlleva, pero se obtiene una mayor especificidad de unión. La pérdida de afinidad se supera con una interacción bivalente con las LCs, en donde entran en juego factores de afección, además de colaborar en los mecanismos de regulación.

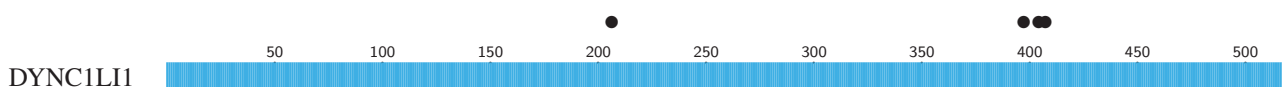


### 3.6.2. El dominio C-terminal

Poco se sabe de este dominio. Está formado por siete repeticiones WD en tándem, que por analogía con otras proteínas WD se puede adivinar su estructura en propulsor  $\beta$  ( $\beta$ -*propeller*), y es la zona directamente responsable en la asociación a las cadenas pesadas [131]. Aunque no se ha caracterizado estructuralmente, su secuencia es hasta un 50 % idéntica a numerosos dominios de repeticiones WD, cuyas estructuras sí que están determinadas, que junto a algunas estructuras de baja resolución que se van obteniendo, se puede crear un modelo aproximado de la organización molecular de este dominio y de su interacción con las HCs.

## 3.7. Las cadenas intermedias ligeras

Es una subunidad exclusiva de las dineínas citoplasmáticas y esencial para su función, aunque se sabe poco de ellas. En vertebrados existen dos genes para la dineína citoplasmática 1 (*DYNC1LI1/2*), además de otro para la de tipo 2 (*DYNC2LI1*) que pueden sufrir procesamiento alternativo y modificaciones post-traduccionales para producir un amplio espectro de isoformas. Son proteínas globulares en el rango de 40 a 60kDa de masa molecular, unos 500 aminoácidos, con un dominio globular en el extremo N-terminal y una cola C-terminal de estructura desordenada [132]. Forman homodímeros que se asocian directamente a las cadenas pesadas, para generar dos poblaciones de dineínas, con una distribución celular y subcelular diferenciada [131, 133]. El dominio Nt contiene homología secuencial con proteínas de unión de nucleótidos [134], y estudios más recientes la engloban en la familia de GTPasas de tipo Ras con un plegamiento G característico que no es capaz de hidrolizar el GTP, por lo que a este dominio pseudo-GTPasa se le asocia una función estructural, más que de interruptor molecular [132], y contiene la zona de unión a la HC de las dineínas, aunque no participa en la asociación a otras proteínas [132, 133], encargándose de ello el dominio C-terminal.



**Figura 3.6:** Cadenas intermedias-ligeras de las dineínas. Es una proteína con un dominio de tipo GTPasa que mantiene un GTP estructural no hidrolizado, pero no se sabe mucho más. • sitios de fosforilación.

## Capítulo 4

# Las Cadenas Ligeras

### Pequeños adaptadores

Las LCs son un conjunto de pequeñas proteínas globulares y homodiméricas que se asocian al dominio Nt de la cadena intermedia de la dineína, además de a numerosas proteínas de la célula. Esto llevó a hipotetizar que la función de las LCs era la de actuar como adaptadores de cargamento celular, asociando proteínas a las dineínas para su transporte intracelular. Sin embargo, los datos termodinámicos y estructurales que fueron apareciendo empezaron a desafiar esta idea, pues, esencialmente, las proteínas celulares se insertan en las LCs en los mismos sitios que las cadenas intermedias. La mayor parte de las proteínas que se asocian a las cadenas ligeras son diméricas, y dado que en las dineínas, las HCs y las ICs, así como cada una de las LCs son todas diméricas, hay un efecto aditivo hacia la interacción de proteínas diméricas con sustratos divalentes. Al dimerizar, las LCs generan dos superficies de interacción idénticas, en las que parece difícil permitir que dos proteínas diferentes se inserten en cada uno de ellos. Es por ello que se tiende actualmente a considerar las cadenas ligeras como grapas moleculares, con una función estructural para el mantenimiento de estructuras diméricas [135]. Hay tres familias de cadenas ligeras, cada una con dos miembros, y todas se asocian a la región desordenada de las cadenas intermedias, donde actúan como andamiaje para el ensamblaje secuencial del complejo de la dineína.





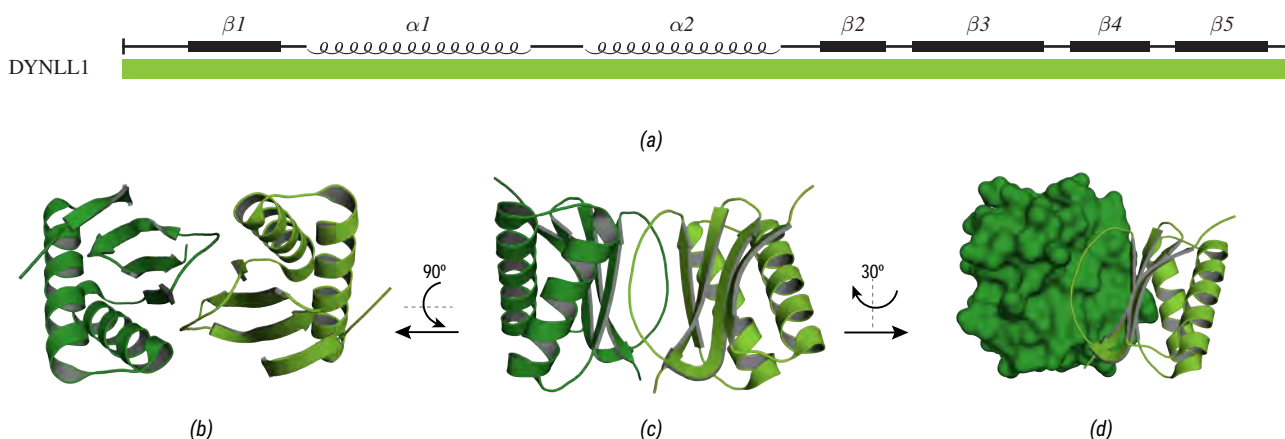


##	Año	DYNLL ( <i>Especie</i> )	Estado <sup>1</sup>	Ligando	Método	PDB ID	Referencias
1.	2000	<i>H. sapiens</i>	D	nNOS	Cristal (2.5 Å)	1CMI	[140]
2.	2001	<i>R. norvegicus</i>	D	apo	RMN	1F3C	[141]
3.	2001	<i>R. norvegicus</i>	D	nNOS	RMN	1F96	[141]
4.	2001	<i>R. norvegicus</i>	D	Bim	RMN	1F95	[141]
5.	2003	<i>R. norvegicus</i>	DYNLL2, M	apo	RMN	1PWJ, 1PWK	[142]
6.	2004	<i>D. melanogaster</i>	M	apo	RMN	1RHW	[143]
7.	2007	<i>D. melanogaster</i>	D	dmDIC(123-138)	Cristal (3.0 Å)	2P2T	[144]
8.	2008	<i>D. melanogaster</i>	D	Swallow	Cristal (2.0 Å)	3E2B	[145]
9.	2008	<i>D. melanogaster</i>	D	apo	Cristal (1.7 Å)	3BRI	[145]
10.	2008	<i>D. melanogaster</i>	S88E, D	Swa	Cristal (1.9 Å)	3BRL	[145]
11.	2008	<i>D. melanogaster</i>	K36P, D	apo	Cristal (2.0 Å)	3DVH	[146]
12.	2009	<i>D. melanogaster</i>	D	Pak1	Cristal (2.5 Å)	3DVP	[146]
13.	2009	<i>D. melanogaster</i>	D	Pak1	Cristal (2.3 Å)	3DVT	[146]
14.	2011	<i>H. sapiens</i>	DYNLL2, D	Artificial	Cristal (2.9 Å)	3P8M	[147]
15.	2011	<i>H. sapiens</i>	DYNLL2, D	Artificial	Cristal (1.3 Å)	2XQQ	[147]
16.	2013	<i>H. sapiens</i>	D	Nek9 (p)	Cristal (2.6 Å)	3ZKF 3ZKE	[148]
17.	2014	<i>D. melanogaster</i>	D	Ana2 (159-168)	Cristal (1.8 Å)	4QH7	[149]
18.	2014	<i>D. melanogaster</i>	DYNLL2	MyoVa	Cristal (1.8 Å)	4D07	[150]

**Tabla 4.1:** Estructuras tridimensionales de DYNLL publicadas en el *Protein Data Bank* (PDB). <sup>1</sup> Datos relevantes sobre las condiciones de obtención de la estructura: wt: estado nativo; D: Dímero; M: Monómero.

#### 4.1.1. Estructura de DYNLL

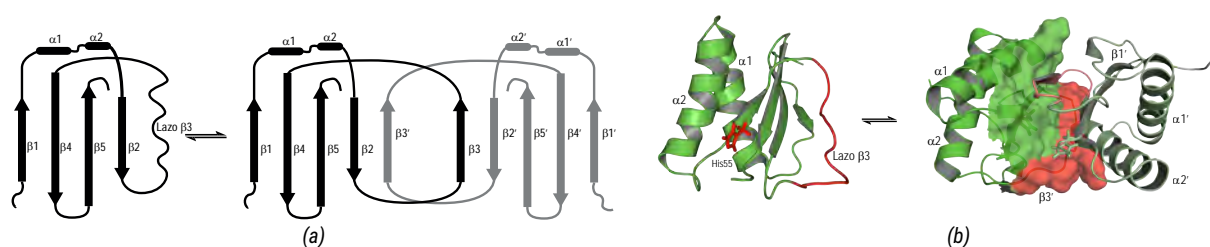
DYNLL1 se pliega en una unidad estructural única (Fig. 4.3), sólo compartida por la otra cadena ligera, DYNLT1, en la que dos hélices  $\alpha$  del extremo N-terminal se apoyan antiparalelas sobre una lámina  $\beta$  antiparalela de cinco hebras [140]. El monómero está plegado y estable en una conformación igual al dímero salvo por la región perteneciente al lazo  $\beta 3$ , el cual se mantiene desordenado, y con una cierta tendencia a estructurarse en hélice  $\alpha$  (Fig. 4.4). Se recopilan en la tabla 4.1 las estructuras obtenidas de DYNLL1.



**Figura 4.3:** Estructura de DYNLL1. (a) Distribución de los elementos de estructura secundaria. (b) y (c) Vistas frontal y lateral de DYNLL1. (d) Representación de la superficie molecular. PDB ID: 3BRI.

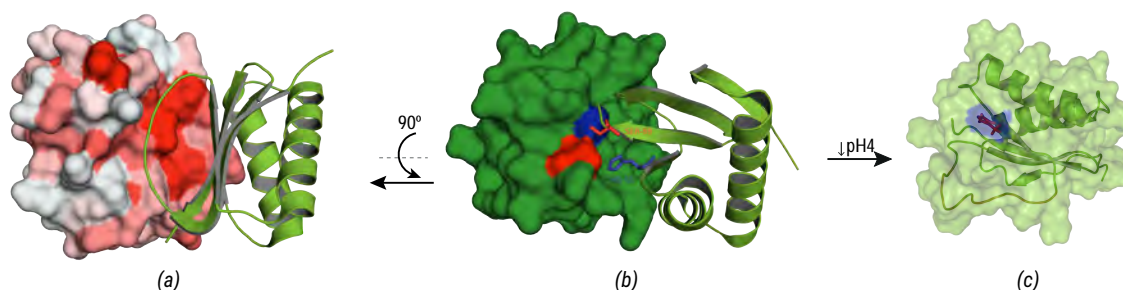
### Dimerización de DYNLL1

La cadena ligera DYNLL1 es una proteína fundamentalmente dimérica. Durante la formación del dímero, las láminas  $\beta$  se enfrentan entre sí, a la vez que el denominado lazo  $\beta 3$  de un monómero se estructura para formar la cadena  $\beta 3'$  y se incorpora a la lámina del otro monómero [151], en una asociación que no es estrictamente un ejemplo de intercambio de dominios (*domain swapping*) [152], porque la conformación de la región implicada no es idéntica en el monómero y el dímero [143].



**Figura 4.4:** Estructura de DYNLL y formación del dímero. a) Elementos de estructura secundaria sobre la secuencia de DYNLL de *H. sapiens*; b) Relación topológica de los elementos de estructura secundaria de LC8, tanto en el monómero como en el dímero; c) Representación tridimensional de DLC8.

Cada lámina  $\beta$  tiene una cadena en cada extremo,  $\beta 1$  y  $\beta 3'$ . La hebra  $\beta 1$  tiene una distorsión de la estructura normal, un acodamiento ( $\beta$ -*bulge*) en la cadena que hace poco favorable la incorporación de una nueva cadena [143], mientras que en el lado de la hebra  $\beta 3'$ , el ambiente hidrófobo y el borde de la lámina favorecen la inserción de una nueva hebra.



**Figura 4.5:** Dímero de DYNLL. a) Distribución de residuos hidrófobos de la superficie de interacción del dímero, coloreados según el índice de hidropatía [153]; b) Localización de los aminoácidos que contribuyen activamente a la disociación del dímero en la superficie de DYNLL, His55 (azul) y Ser88 (rojo) c) Localización de la His55 (azul) en el monómero inducido a pH 4.

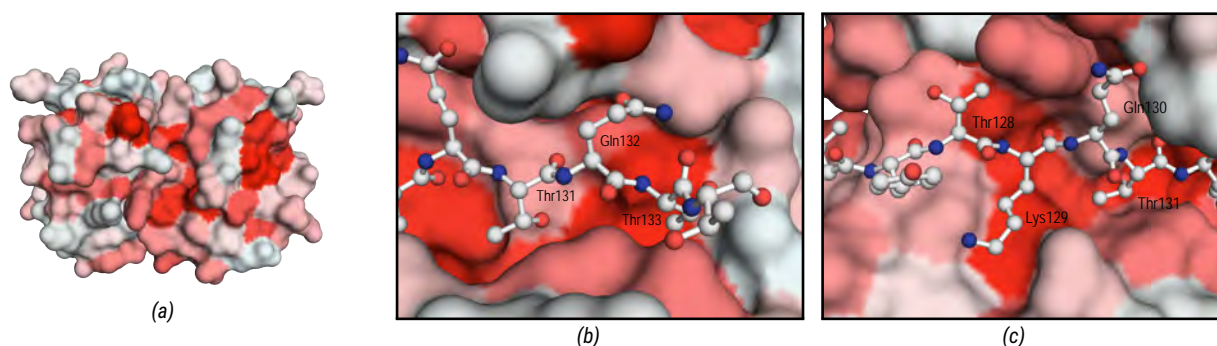
La dimerización de DYNLL1 es una asociación relativamente fuerte y de muy alta especificidad, gracias a la gran superficie de contacto entre los dos monómeros, que suministra un conjunto de interacciones que contribuyen a la fuerza de dimerización, a la vez que permite una dinámica conformacional, como los movimientos de cizalla. El intercambio de una cadena  $\beta$  y la correspondiente red de puentes de hidrógeno confieren un alto grado de especificidad, pues no se conocen otras proteínas que interaccionen con DYNLL1 de esta forma [145]. Es de especial importancia la gran flexibilidad estructural que tiene la región del denominado lazo  $\beta 3$ , que forma la hebra  $\beta 3'$  en el dímero. En el monómero se mantiene desestructurado, con una cierta tendencia a formar una hélice  $\alpha$  anfipática,

en la que un lado se mantiene más hidrófobo y se orienta hacia el interior, y otra más polar hacia el solvente [142], una conformación que mantiene estable al monómero. Al formarse el dímero, este lazo se estructura en una cadena  $\beta$  aunque sigue manteniendo una cierta flexibilidad conformacional.

En condiciones fisiológicas, DYNLL1 está en un equilibrio entre el monómero y el dímero, y su estado de dimerización de DYNLL1 está sometido a regulación celular. El dímero se mantiene estable gracias a la combinación de interacciones hidrófobas distribuidas en dos parches por la superficie de contacto en la lámina  $\beta$ , y por una red de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas entre aminoácidos de los monómeros, enterrándose en la interacción una superficie de unos  $800 \text{ \AA}^2$  de cada monómero. Según las especies y en condiciones fisiológicas, DYNLL1 es un dímero estable en mamíferos, tiene una asociación más lábil en *D. melanogaster* y es fundamentalmente monomérica en el hongo *Aspergillus niger*. Entre los factores que afectan al estado de dimerización de DYNLL1 están el pH, la fosforilación o la concentración de proteína, y siempre en un equilibrio reversible [139].

#### 4.1.2. Unión de los ligandos a DYNLL1 y la dinámica conformacional

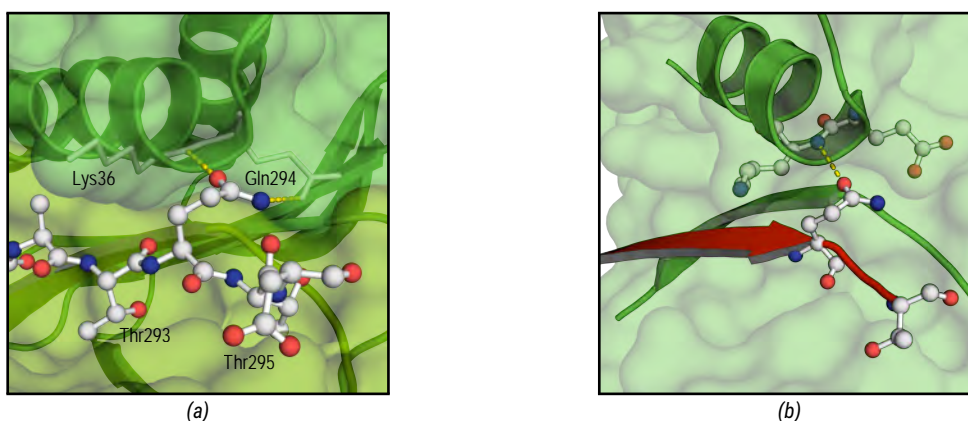
La formación del dímero de DYNLL1 genera el sitio de unión a las proteínas celulares. Entre los dos monómeros, justo en la interfase y de forma simétrica, se forman dos surcos que acogen a los ligandos, formados por residuos de los dos monómeros: la cadena intercambiada  $\beta 3$ , en el fondo del canal, es quien recibe a la hebra entrante, mientras que a un lado se mantienen las cadenas  $\beta 1$  y  $4$  y al otro, parte de la hélice  $\alpha 2'$ . En el surco, la parte más profunda es de carácter hidrófobo y tiene una cierta polaridad electrostática hacia los extremos, con predominancia positiva en un lado y predominancia negativa en el otro [154]. Las proteínas entrantes se insertan en el surco, añadiendo una cadena extra en la lámina preformada (la hebra  $\beta 6$ ), y queda embutida entre la hebra  $\beta 4$  y la hélice  $\alpha 2'$ . En su estado vacío, el surco está completamente relleno de moléculas de agua, que se estructuran estableciendo una red de interacciones con el esqueleto peptídico que queda expuesto, y protegiendo el interior hidrófobo. Todas estas moléculas son sustituidas por el péptido entrante.



**Figura 4.6:** El surco de interacción. Al formarse el dímero, se estructura el surco donde interacciona con sus ligandos. (a) Representación de la superficie en función del índice de hidropatía. (b) Detalle de la glutamina 0 (Gln133 en IC de *D. melanogaster*), con las treoninas +1 y -1 insertándose en los huecos hidrófobos. (c) Detalle del extremo Nt del mismo péptido de IC, en el que destaca la lisina -3 conservada.

DYNLL1 se une a cortos motivos peptídicos presentes en las proteínas celulares, que pueden ser englobados en dos grandes tipos de secuencias consenso: Las de tipo  $-KxTQ_0Tx-$  [155, 156], y tipo  $-xGIQ_0VD-$ , y entre ellas existe una gran heterogeneidad, favorecida por el hecho de que el polipéptido entrante interactúa además por medio de sus esqueletos peptídicos. Un tercer tipo de secuencia, más minoritario, está representado por las secuencias de Pak1 o la miosina Va, y carecen de la muy conservada glutamina. Sin embargo, su ausencia está compensada con otro tipo de interacciones, que permiten una unión específica, aunque más débil. La especificidad de los ligandos se adquiere, pues, con la combinación de la participación de las regiones periféricas del canal y la dinámica conformacional de DYNLL1, que permite amoldarse a los péptidos [154].

Los ligandos contienen en su mayoría una glutamina altamente conservada que se define por convenio como la posición 0 (Fig. 4.6a). Así la secuencia insertada se puede reducir a 11 aminoácidos, entre el residuo  $-8$  en el extremo Nt al  $+2$  en el C-terminal, aunque sólo 7 forman el núcleo importante, y la glutamina en 0 es determinante para la interacción.



**Figura 4.7:** La glutamina en  $P_0$  de Swallow establece una interacción muy conservada con Lys36. (a) Detalle de Gln y los aminoácidos circundantes. (b) Detalle del puente de hidrógeno entre el grupo carboxilato de glutamina en  $P_0$  de Swallow (Gln294) con el nitrógeno del enlace peptídico de Lys36 de DYNLL1, en el extremo N-terminal de la hélice  $\alpha_2$ .

La glutamina está flanqueada por las posiciones  $-1$  y  $+1$  que se orientan hacia el interior hidrófobo del bolsillo (Fig 4.6b). En unos casos, las treoninas presentes en estas posiciones podrían formar puentes de hidrógeno con el esqueleto peptídico de DYNLL1. Otro residuos muy conservados son la lisina en posición  $-3$  y el aspártico en  $-4$ , los cuales establecen puentes de hidrógeno con otros residuos de DYNLL1, como Thr67. En las secuencias que carecen de la glutamina no se forma el puente de hidrógeno con la lisina de la hélice  $\alpha_2$  (Lys36). En su lugar, la interacción es compensada mediante el aspártico en posición  $-4$ , y con una interacción más débil de la Ser $_0$  [146]. Así, los aminoácidos que conservan la Gln $_0$  y el Asp $_{-4}$  tendrían la mayor afinidad, aquellos que mantengan la Gln $_0$ , pero no Asp $_{-4}$ , tendrían una afinidad intermedia, y la unión más débil recae en aquellas secuencias que solo conservan el residuo Asp $_{-4}$ . En diferentes estudios se le da también bastante importancia al residuo en  $-3$  y  $-5$  como contribuyentes a la afinidad. En definitiva, aunque la secuencias se pueden clasificar en dos, la mayoría de ellas contienen una mezcla de ambas.



### 4.1.3. Funciones de DYNLL1

Desde su descubrimiento en las dineínas flagelares de *C. reinhardtii*, se han descrito muchas proteínas diferentes que interaccionan con DYNLL1. Este hecho, y la gran conservación de la secuencia de DYNLL1 hacen que DYNLL1 esté implicada en procesos conservados evolutivamente. DYNLL1 fue descrita como componente integral de las dineínas, tanto las citoplasmáticas como las flagelares [157]. Posteriormente comenzó a verse que era capaz de interaccionar con un conjunto creciente de proteínas celulares y virales, lo que llevó a desarrollar la hipótesis de que las LCs actuaban como adaptadores moleculares para la asociación de proteínas a las dineínas, relacionándose directamente la interacción con DYNLL1 con el transporte celular para proteínas como Egalitarian, Swallow o p53BP1.

Sin embargo, conforme fueron apareciendo estudios estructurales y termodinámicos de las interacciones, se fue viendo que todos los ligandos de DYNLL1 ocupan exactamente el mismo sitio. Una posibilidad podría ser que dos proteínas diferentes se unieran a cada uno de los sitios, pero el hecho de que ambos sitios sean simétricos, y el que la mayor parte de las proteínas que se unen también sean dimericas, hacen muy difícil imaginar cómo se pueden discriminar las proteínas para unir dos ligandos diferentes en cada surco. Más que asociar proteínas a las dineínas para su transporte microtubular, DYNLL1 parece servir como grapa molecular, una proteína que favorece y estabiliza el ensamblaje de complejos moleculares [135], cuya mejor caracterización es la dineína, donde la asociación de las LCs con las ICs forma un pre-complejo que dirige el ensamblaje con las cadenas pesadas (HCs) y la estabilización global de las dineínas. Este modelo de estabilización de complejos de orden superior se puede aplicar también a otras proteínas como Swallow [158], donde, nuevamente, una proteína se une a DYNLL1 y regiones cercanas con propensión a adquirir estructura helicoidal, se reestructuran en una hélice superenrollada dimerica.

En *D. melanogaster*, la delección parcial produce numerosos efectos morfogénicos, como defectos en el desarrollo de las alas o esterilidad, mientras que la eliminación total es letal en el embrión, inducido por altos niveles de apoptosis, en cuya señalización participan algunos de sus ligandos, como la nNOS o Bim.

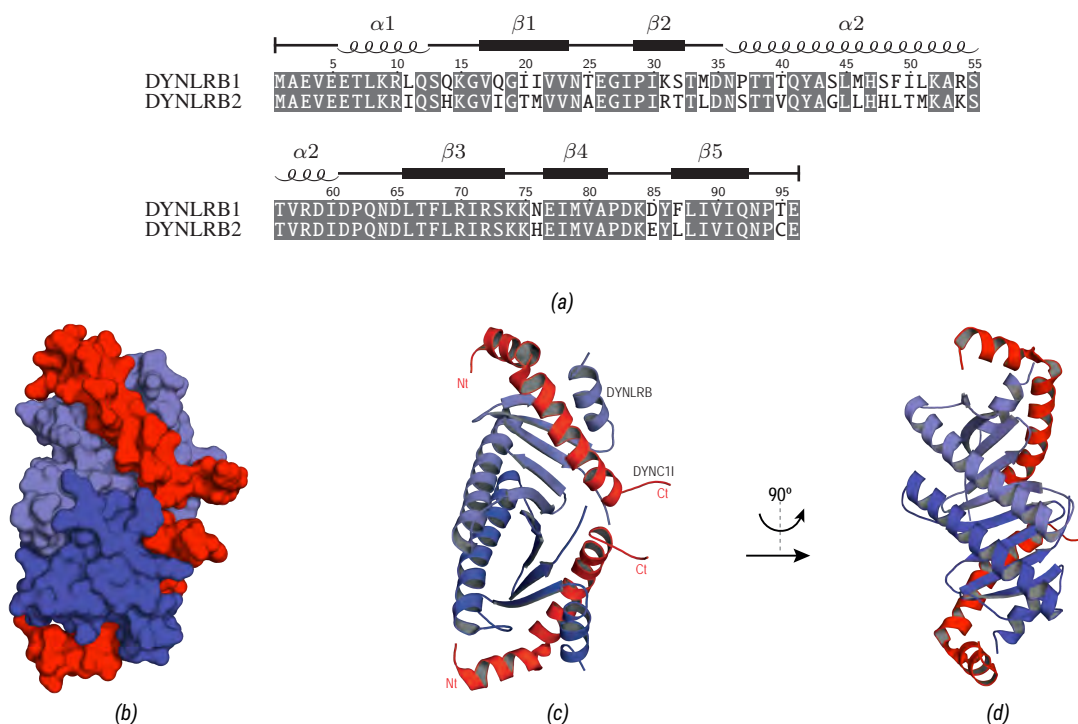
DYNLL1 está implicada en la regulación de la expresión génica por el potencial redox. I $\kappa$ B $\alpha$  es el inhibidor del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, mediante la ocultación de las señales de localización nuclear. Cuando se estimula el TNF- $\alpha$ , se fosforila el inhibidor y se marca para su degradación en el proteasoma. DYNLL1 actúa como regulador negativo de esta ruta, asociándose a I $\kappa$ B $\alpha$  para evitar su marcaje. Pero el aumento del estado de oxidación por la producción de especies reactivas (como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produce la disociación dependiente del estado redox del inhibidor, y la activación de la ruta. En este sentido, la cisteína en la posición 2 (Cys2), presente en DYNLL1, pero no en DYNLL2 (Ser2), podría ser la responsable de sentir el estado redox de la célula [159].

DYNLL1 participa también en la regulación de la apoptosis gracias a su interacción con BimL, un regulador proapoptótico. Lo secuestra y aleja del antiapoptótico Bcl-2. Las señales que inducen apoptosis producen la disrupción de la interacción entre BimL y DYNLL1, probablemente por

fosforilación de la Ser88, y así se libera BimL que interacciona con Bcl-2, inhibiendo sus funciones antiapoptóticas.

## 4.2. La Familia DYNLRB

La familia DYNLRB/Roadblock de cadenas ligeras es la más desconocida de las LCs. Fueron identificadas como cadenas ligeras de las dineínas flagelares en *C. reinhardtii* y denominadas LC7, aunque también son conocidas como Km23. Están relacionadas evolutivamente con las NTPasas [160], están implicadas con el transporte axonal en *D. melanogaster* y rápidamente se vieron implicadas en la estructura de las dineínas [161]. También tienen dos miembros (DYNLRB1/2) (Fig. 4.8), que forman homodímeros de expresión ubicua pero diferencial, se unen a todas las cadenas intermedias en el final del dominio Nt, muy cerca del dominio de repeticiones WD (aminoácidos 221-258) [162], así como a un número reducido de proteínas celulares.



**Figura 4.8:** (a) Comparación de las secuencias de los dos miembros de la familia DYNLRB de *H. sapiens*. (b) Representación de la superficie molecular de un complejo entre el dímero de DYNLRB y la cadena intermedia, que se estructura en hélice  $\alpha$  y se orienta de forma antiparalela con la otra IC. (c) y (d) Vistas lateral y frontal de la representación de los elementos de estructura secundaria.

Sólo unas pocas estructuras de DYNLRB han sido publicadas, recopiladas en la tabla 4.2. En su estructura tridimensional no comparte plegamiento con las otras cadenas ligeras, aunque sí tiene homología estructural con algunos dominios celulares de origen ancestral [163]. Tiene una distribución de los elementos de estructura secundaria muy diferente, en la que una gran lámina  $\beta$  se retuerce alrededor del haz helicoidal formado por la hélice  $\alpha2$  de cada monómero, y en total se establece una

Año	Método	Especie	Ligando	PDB-ID	Ref
2005	RMN	<i>M. musculus</i>	<i>Apo</i>	1Y4O	[167]
2005	RMN	<i>H. sapiens</i>	<i>Apo</i>	1Z09	[168]
2006	Cristal (2.1 Å)	<i>H. sapiens</i>	<i>Apo</i>	2HZ5	[169]

**Tabla 4.2:** Estructuras tridimensionales de DYNLRB, depositadas en el PDB. Sólo una de ellas ha sido obtenida con su ligando unido, la cadena intermedia.

extensa superficie de contacto.

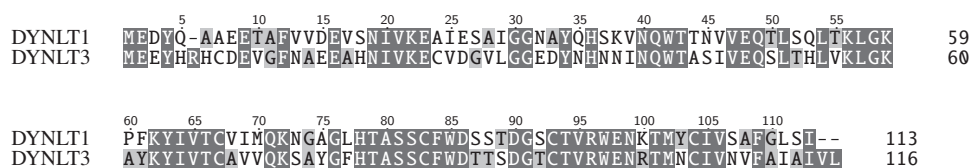
Muy pocas proteínas han sido descritas como ligandos de DYNLRB. Además de la cadena intermedia, DYNLRB interacciona con el receptor de TGF $\beta$  [164], el transportador de folato [165] o la GTPasa Rab6 [166]. En la cadena intermedia, se asocia con los residuos 182-219, que se pliegan en una hélice  $\alpha$  partida y se inserta sobre la lámina  $\beta$ , aunque a diferencia de las otras cadenas ligeras, ambas cadenas se insertan de forma antiparalela entre sí. Además, la interacción ocurre fundamentalmente mediante las cadenas laterales de los aminoácidos, de tal forma que el reconocimiento es mucho más selectivo que en el caso de DYNLL1 o DYNLT1.

En las dineínas, DYNLRB actúa como parte de la estructura, y su interacción se ve favorecida por la formación de un complejo previo entre las otras cadenas ligeras y la cadena intermedia [170], y esta interacción depende directamente de que Roadblock esté fosforilada [171]. Alternativamente, está implicada en la señalización del complejo TGF $\beta$ , actuando en su ensamblaje y como intermediario en la activación de las dineínas dependiente de la señalización TGF $\beta$  [172].

### 4.3. La Familia DYNLT

Las proteínas de la familia DYNLT (DYNLT1/Tctex1 y DYNLT3/RP3) son cadenas ligeras (LCs) homólogas estructuralmente a DYNLL1 aunque no comparten homología secuencial. También son un componente integral de las dineínas flagelares y citoplasmáticas, y se asocian a numerosas proteínas celulares. Sin embargo, a pesar de los numerosos esfuerzos, no se ha conseguido determinar una secuencia consenso en las proteínas que interaccionan con DYNLT1, ya que, aunque parecen identificarse algunos patrones, las proteínas descritas no comparten una secuencia clara. En general, el conocimiento que se tiene de la estructura, los requerimientos secuenciales de interacción y la función de las cadenas intermedias (ICs) de la familia DYNLT es más exiguo que en el caso de DYNLL. En la figura 4.9 se representa la comparación de las secuencias de los miembros más representativos de la familia DYNLT de cadenas ligeras.

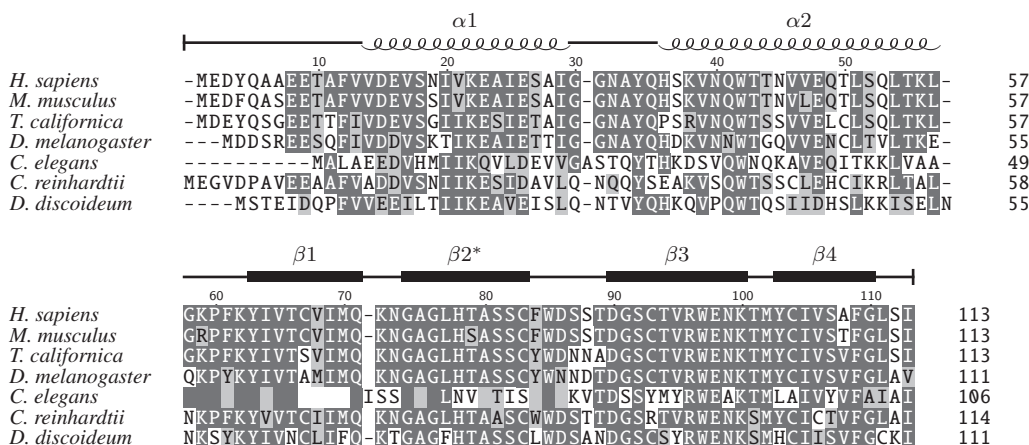
**DYNLT1/Tctex1** (de *t-complex testis-expressed*) fue identificada en el Complejo *t*, una región del cromosoma 17 de ratón cuya variante, el haplotipo *t*, produce una gran distorsión de la transmisión mendeliana, y DYNLT1 podría ser un posible candidato como responsable de esta distorsión [173]. En heterocigosis (+/*t*), el haplotipo *t* se transmite al 99 % de la descendencia, mientras que en homoci-



**Figura 4.9:** Comparación de las secuencias de la familia DYNLT (DYNLT1 y DYNLT3) de *H. sapiens*.

gosis (*t/t*), los machos son completamente estériles y los espermatozoides son incapaces de fecundar. Posteriormente se vio a DYNLT1 como un componente de las dineínas citoplasmáticas [174] y flagelares [175], siendo en ambos casos la misma proteína procedente del mismo gen, y de esta forma se asoció la dineína con funciones en la transmisión meiótica. Además, se han ido identificando numerosas proteínas celulares que se asocian a DYNLT1, aunque la función de estas interacciones está sin determinar.

**DYNLT3/RP3** fue identificada en *H. sapiens* como responsable de la retinitis pigmentosa de tipo 3, ligada al cromosoma X (*locus* Xp21) [176]. Posteriormente se confirmó que aunque estaba en el mismo *locus*, éste no era el gen responsable de esta condición, pero que sí formaba parte de las dineínas citoplasmáticas con un patrón de expresión diferente a DYNLT1 en tejidos y células [177]. Comparte con DYNLT1 un 60 % de identidad, que podría dar cuenta de su diferente patrón de expresión y de interacción. Se han encontrado algunas proteínas que interaccionan con DYNLT3, pero ninguna en exclusividad.



**Figura 4.10:** Alineamiento de las secuencias del gen *DYNLT1* y homólogos en miembros representativos de eucariotas.

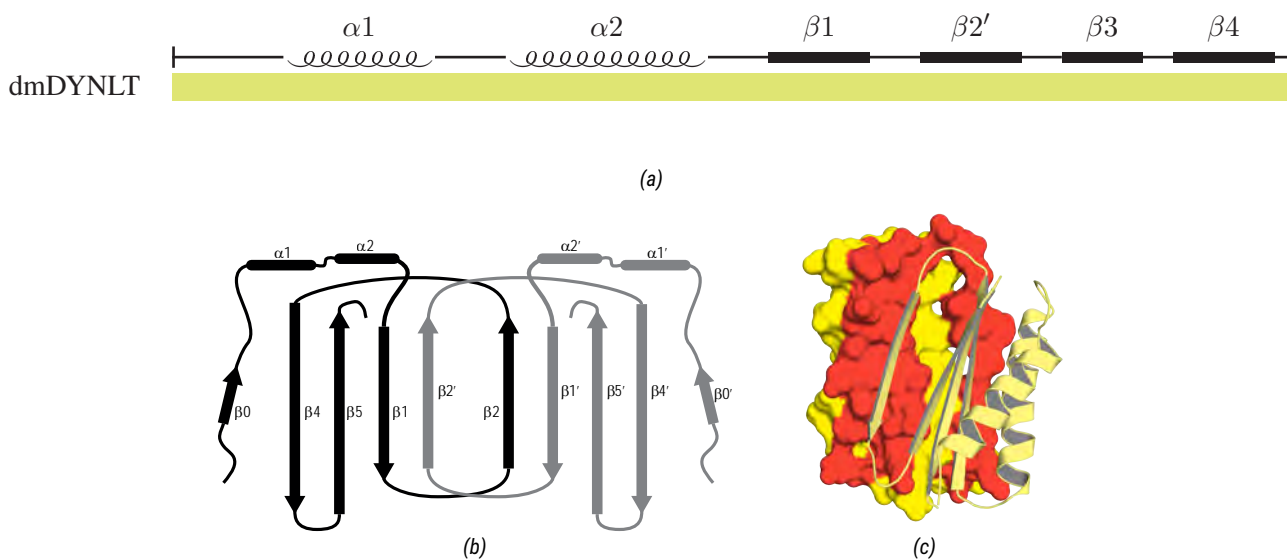
**DYNLT1 Domain containing proteins (TC1D1-4)** Al mismo tiempo, se han descrito varias proteínas que contienen un dominio tipo DYNLT1 (*DYNLT1 Domain containing protein*, TC1D1-4 [178]), de funciones desconocidas, entre las que destacan TC1D3 ( $\equiv$  LC2, Tctex2) [179], otro gen dentro del

Complejo *t* y componente de las dineínas del brazo externo, y TC1D4 ( $\equiv$  Tctex2 $\beta$ ), implicada en la señalización de los receptores del TGF $\beta$  [180]. Son las más desconocidas. En *D. melanogaster* existe un único representante de la familia, el gen Dlc90F que codifica a *d*DYNLT1 [181], y su delección produce nuevamente machos estériles por defectos en la movilidad del espermatozoide [182].

En mamíferos, ambos miembros de la familia DYNLT son expresados de forma diferencial, a nivel tisular y a lo largo del desarrollo [183]. DYNLT1 se expresa en cerebro fetal, y, aunque decae en este órgano en el adulto, mantiene una expresión más ubicua en el resto de tejidos, mientras que DYNLT3 está fundamentalmente expresada en el cerebro adulto, riñones y ovarios, y especialmente, en la retina [184], con una expresión más restringida [178].

### 4.3.1. Estructura y dimerización

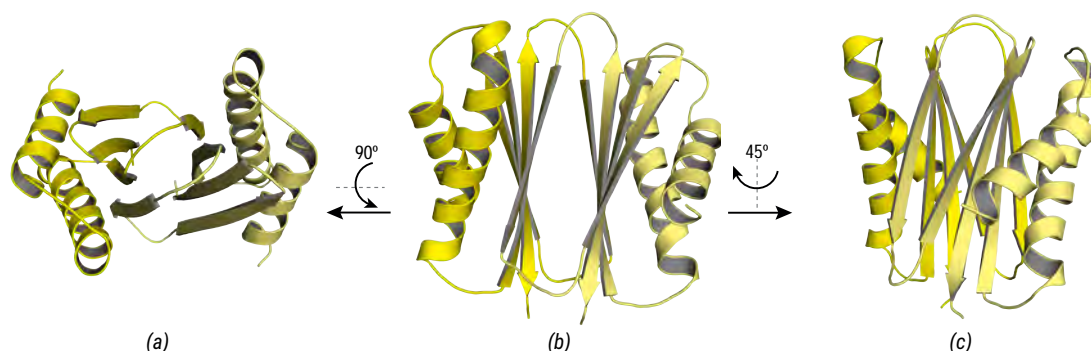
Las proteínas (DYNLT1/3) son en ambos casos pequeñas, globulares y diméricas, con una estructura homóloga a la de la cadena ligera (*Dynein Light Chain, LC*) DYNLL1 a pesar de la escasa identidad de secuencia [161, 185, 186]. Son dímeros obligados; los estudios del equilibrio de desnaturalización fueron incapaces de obtener monómeros plegados en las diferentes condiciones, y determinaron su constante de disociación en el orden femtomolar, una asociación muy fuerte que define que DYNLT1 es un homodímero indivisible en condiciones fisiológicas [187], y al contrario que con DYNLL1, no se ha conseguido un monómero estable con DYNLT1, lo que podría tener implicaciones funcionales y estructurales para la formación del complejo de la dineína.



**Figura 4.11:** Estructura de DYNLT1 (PDB ID: 3FM7). (a) Elementos de estructura secundaria de la proteína DYNLT1 de *Drosophila melanogaster*; (b) Distribución topológica de los elementos de estructura secundaria de DYNLT1. Se aprecia la lámina  $\beta$  de 4 hebras, en la que una procede del monómero compañero; (c) Representación tridimensional de DYNLT1 señalando los dos monómeros en diferentes tonos de amarillo y la hebra  $\beta$  intercambiada en rojo. No existe el monómero plegado y estable de DYNLT1.

Su estructura es en esencia igual a la de DYNLL1, con una distribución similar de los elementos

de estructura secundaria (Fig. 4.11), incluyendo la presencia de una cadena  $\beta$  intercambiada ( $\beta 2$ ), con la diferencia de que DYNLL1 comienza en su extremo Nt con una hebra  $\beta$  ( $\beta 0$ ) que no aparece en DYNLT1 (Fig. 4.11b) [72, 188, 189].

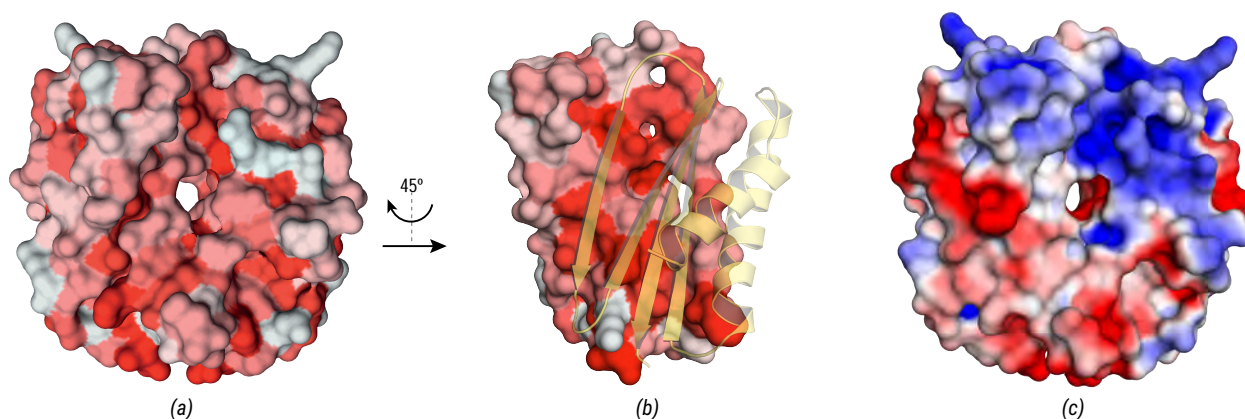


**Figura 4.12:** Estructura de DYNLT1. Representación de los elementos de estructura secundaria de DYNLT1 de *H. sapiens*, modelada sobre la estructura de *D. melanogaster*, en el que se puede ver el enfrentamiento de las láminas  $\beta$ , la hebra  $\beta$  intercambiada y las hélices  $\alpha$ . a) Vista frontal; b) Vista lateral; c) Vista ladeada.

La interfaz de dimerización comprende exclusivamente las láminas  $\beta$  enfrentadas y la hebra intercambiada. En el lado opuesto de la lámina se apoyan las hélices  $\alpha$  antiparalelas del extremo N-terminal. Mientras que en DYNLL1, la lámina  $\beta$  que se forma contiene cinco hebras ( $4+1'$ ), DYNLT1 forma sus láminas con cuatro hebras ( $3+1'$ ), y en ambos casos, se extienden con la hebra extra del ligando [72]. DYNLT1 es más grande, sus elementos son más largos, tanto las hélices  $\alpha$  como las cadenas  $\beta$ . Particularmente, la hebra intercambiada entre los monómeros abarca unos 10 aminoácidos en DYNLT1, mientras que en DYNLL1 sólo se implican cinco residuos. Esto se traduce en que DYNLT1 tiene una mayor superficie de contacto entre los monómeros, que asciende a unos  $1500 \text{ \AA}^2$ , en contraste con los  $700\text{-}1000 \text{ \AA}^2$  de DYNLL1 [185]. Aunque se ha encontrado que la sobre-expresión en células de cultivo permite la heterodimerización de DYNLT1 con DYNLT3, un hecho podría aumentar la diversidad de dineínas y sus funciones en la célula, no se ha visto una relevancia fisiológica real porque no son capaces de interactuar con las cadenas intermedias (ICs) [126].

La formación del dímero establece una estructura compacta, que al igual que en DYNLL1, configura dos surcos simétricos de carácter hidrófobo (Fig 4.13a), y en el caso de *hDYNLT1*, también con una cierta polaridad electrostática (Fig. 4.13c). En este surco se insertan los ligandos con los que interactúa, y por homología con DYNLL1, se asociarían formando una estructura extendida al extremo de la lámina formada en el dímero y aumentándola en una hebra. Esto solo ha podido ser confirmado con las únicas estructuras cristalográficas de un ligando unido al dímero de DYNLT1, obtenidas con una interacción quimérica entre DYNLT1 procedente de la mosca *D. melanogaster* y la cadena intermedia de *R. norvegicus* [72, 189]). En estas estructuras se puede comprobar que el ligando se inserta en los surcos laterales, de forma dimérica, simétrica y extendida. Se establecen interacciones fundamentalmente hidrófobas y puentes de hidrógeno que implican al esqueleto peptídico, propiedades que reducen el reconocimiento específico de una secuencia y contribuye a maximizar la diversidad de ligandos posibles (Fig. 3.5). En la cadena intermedia (*Dynein Intermediate Chain*, DIC) se identifican





**Figura 4.13:** Propiedades superficiales de DYNLT1. (a) Vista lateral del canal que se forma en la interfase del dímero. Se puede ver la alta proporción de residuos aromáticos que se concentran en el surco. (b) Detalle de la superficie de contacto entre los monómeros, altamente hidrófoba. (c) Distribución del potencial electrostático de la superficie de DYNLT1. Se puede apreciar la cierta polaridad que tiene la zona de las hélices  $\alpha$ . Estas estructuras son modelos de la secuencia de DYNLT1 de *H. sapiens*, modelada sobre la estructura cristalográfica de DYNLT de *D. melanogaster*, creado con el programa Modeller [190].

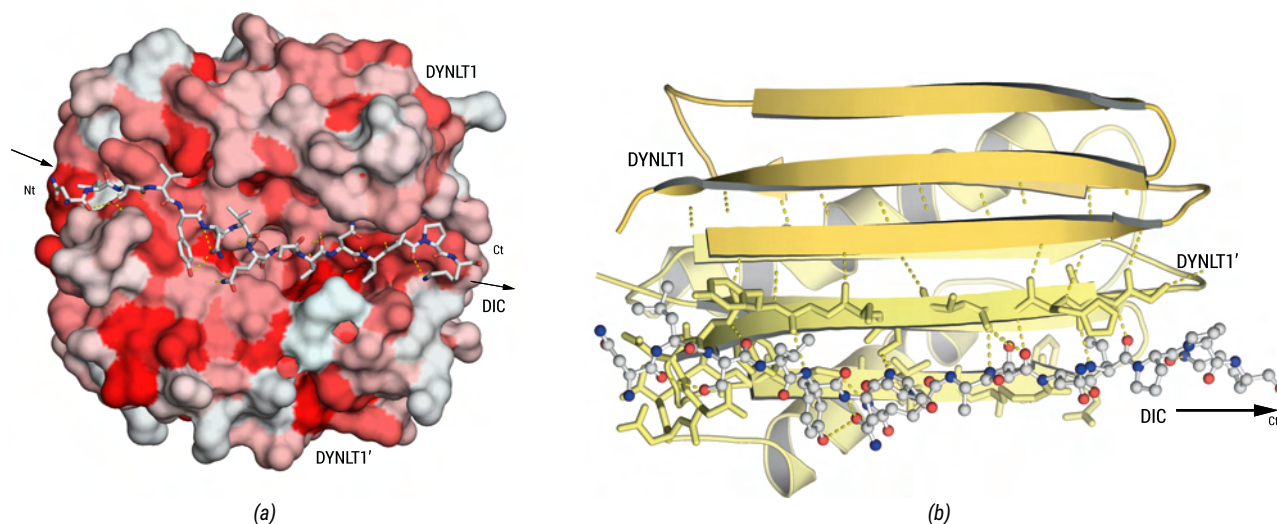
posiciones hidrófobas cuya sustitución disminuye, e incluso anula la interacción [72], y en conjunto configuran una forma de reconocimiento de ligandos compartida por otros sistemas promiscuos como la interacción péptido-MHCII. En la figura 4.14b se puede ver que la cadena  $\beta$  formada contiene una distorsión de su estructura, causada por la inserción de un residuo que modifica el registro de los puentes de hidrógeno típicos entre el esqueleto peptídico del ligando y la hebra intercambiada  $\beta 2'$ . Este codo ( $\beta$ -bulge) impide la incorporación de nuevas hebras para la extensión de la lámina de una forma que podría conllevar agregación, pero añade incertidumbre al estudio de las funciones de DYNLT1, porque no se explica como la interacción es permitida con tal variedad estructural y secuencial, y manteniendo las especificidades.

Año	Método	Especie	Ligando	PDB-ID	Ref
2005	RMN	<i>C. reinhardtii</i>	apo	1XDX	[188]
2005	Cristal (1.7 Å)	<i>D. melanogaster</i>	apo	1YGT	[185]
2007	Cristal (2.8 Å)	<i>D. melanogaster</i>	IC2 ( <i>R. norvegicus</i> )	2PG1	[72]
2009	Cristal (3.5 Å)	<i>D. melanogaster</i>	DIC ( <i>D. melanogaster</i> )	3FM7	[189]

**Tabla 4.3:** Recopilación de las estructuras publicadas de DYNLT1, indicando el método utilizado y el código identificador en el *Protein Data Bank* (PDB). Cabe destacar que se realizaron estudios estructurales por RMN, pero que no resultaron en ninguna estructura depositada [161]. Hay un cierto número de estudios estructurales con DYNLT1 de mamífero, pero cuyas coordenadas tridimensionales no han sido depositadas en las bases de datos dedicadas.

### 4.3.2. Interacciones de DYNLT

La familia DYNLT puede unirse a un conjunto muy heterogéneo de ligandos. Se han descrito una treintena de proteínas celulares y virales que interaccionan con DYNLT1 y con DYNLT3 (reunidas en la tabla 4.4). Este gran número dificulta los estudios funcionales, porque además son proteínas im-



**Figura 4.14:** Interacción de DIC con DYNLT1. (a) Vista lateral. La DIC es el único ligando cuya interacción ha sido visualizada por cristalografía. Como se puede ver, se inserta en la zona hidrófoba y no se representa una cadena  $\beta$ . (b) Vista cenital. La distribución normal de los puentes de hidrógeno que estructura la lámina  $\beta$  antiparalela se han alterado en la región N-terminal del péptido de DIC por la inserción de un aminoácido y la torsiones del esqueleto peptídico. Esta distorsión ya comienza entre las cadenas de uno y otro monómero. PDB ID: 3FM7 [189].

plicadas en multitud de procesos celulares. En general, los trabajos que han descrito la interacción de estas proteínas con DYNLT1 estaban dedicados a esa proteína en cuestión, siendo la propia DYNLT1 un objetivo secundario. Por ello no hay apenas estudios profundizando en los requerimientos que tienen las proteínas para mediar su interacción con DYNLT1. Al poner en común las secuencias rastreadas se puede ver que no tienen homología entre ellas, y a diferencia de los sitios de unión de DYNLL1, no se puede establecer claramente ningún patrón o definir una secuencia consenso.

El primer estudio que estableció la secuencia consenso de unión a DYNLT1 definió una región polibásica en la cadena intermedia,  $-L^{124}GRRLHKLDVS-$ , una secuencia que también aparecía en algunas proteínas que se unían a DYNLT1, como Doc2 $\alpha$  o la región citoplasmática de CD5, pero que no estaba en otras (por ejemplo la rodopsina) [161]. Sin embargo, con la publicación de los cristales de DYNLT1 asociada con la DIC (en un complejo junto a DYNLL1) se pudo ver con claridad que esta región polibásica no formaba parte de la secuencia utilizada en los cristales. La secuencia identificada en estos cristales correspondían a la isoforma 2A de DIC de *M. musculus* y la secuencia abarcada por la interacción con DYNLT1 (de *D. melanogaster*) era  $-GRGPIKLGMAKITQVDFPPREIV-$ . Aun así, ni siquiera esta secuencia determinada por cristalografía tiene homología con las otras proteínas, por lo que la identificación definitiva de la secuencia consenso permanece sin aclarar.



	Proteína	Especie	Región	Protein Type	Función	Referencias
1.	Dyn IC	Todos	Nt Domain	Motor	Ensamblaje del motor de las dineínas.	[72, 126, 129, 161]
2.	p59 <sup>FynK</sup>	<i>H. sapiens</i>	Nt-domain (1-19)	Familia Src Tyr-K	Implicación en la citocinesis.	[191, 192]
3.	p59 <sup>FynK</sup>	<i>Torpedo californica</i>			Fosforilación de DYNLT1 (Tyr4).	[193]
4.	CD5	<i>H. sapiens</i>	CTD (403-495)	Receptor <i>scavenger</i>	Anclaje para el transporte retrógrado.	[194]
5.	Doc2α, β	<i>H. sapiens</i>	(1-32)	Sensor de Ca <sup>2+</sup>	Anclaje a vesículas para transporte retrógrado.	[195]
6.	Rhodopsin	<i>H. sapiens</i>	CTD	GPCR	Transporte a la membrana apical de las células retinales.	[196]
7.	FIP-1 (RagA)	<i>H. sapiens</i>	Dominio Nt	GTPasa	Implicación en el ciclo de replicación de adenovirus.	[197]
8.	Trk-A, B, C	<i>H. sapiens</i>	CTD (464-484)	Receptor Tyr-K	Internalización y transporte de los receptores al soma neuronal.	[198]
9.	CD155	<i>H. sapiens</i>	CTD (368-393)	Receptor de tipo Ig	Endocitosis y transporte axonal retrógrado, vía de entrada de poliovirus.	[199, 200]
10.	Tastin	<i>H. sapiens</i>		Adhesión celular	Asociación a los microtúbulos.	[201]
11.	VDAC	<i>H. sapiens</i>	CTD	Porina	Modulación de la función mitocondrial en la tolerancia a la hipoxia.	[202, 203]
12.	BMPR-II	<i>H. sapiens</i>	CTD (509-529)	Receptor TGFβ	Fosforilación de DYNLT1.	[204]
13.	Nav1.8	<i>M. musculus</i>			No determinado.	[205]
14.	PTH/PTH-R	<i>H. sapiens</i>	CTD (478-511)	GPCR	Endocitosis del receptor.	[206]
15.	NPC2D	<i>D. melanogaster</i>			No analizado bioquímicamente.	[207]
16.	HspB9	<i>H. sapiens</i>	CTD (47-159)	Chaperona de estrés térmico	Translocación nuclear.	[208]
17.	Ca <sup>2+</sup> channel α1A	<i>H. sapiens</i>	C- terminal domain (2018-2097)	Canal de Ca <sup>2+</sup>	Control de la expresión superficial de los canales de Ca <sup>2+</sup> dependientes de voltaje.	[209]
18.	Supervillin	<i>Bos taurus</i>	(343-571)		Regulación de las adhesiones focales.	[210]
19.	Gprotβ	<i>H. sapiens</i>	CTD(40-57)	GPCRs	regulación de la diferenciación neuronal.	[211]
20.	Proteína M	<i>Mason-Pfizer Monkey Virus</i>	CTRS (52-60)	Matriz vírica	Localización pericentriolar.	[212]
21.	Lfc	<i>M. musculus</i>	(139-161)	factor de intercambio del nucleótido de guanina ( <i>Guanosine Exchange Factor</i> , GEF)	Regulación negativa de la mitosis y la formación de fibras de estrés inducida por Lfc; formación de un complejo ternario Lfc:DYNLT1:DIC.	[213–215]
22.	Rab3D	<i>M. musculus</i>	Gbox (74-95)	GTPasa	Reclutamiento de la dineína para el transporte vesicular.	[216]
23.	Proteína M	Flavivirus	Nt domain	Proteína de membrana	Fases tardías de la infección vírica.	[217]
24.	Orexin-receptors	<i>M. musculus</i>	CTD (400-425)	GPCR	Modulación de la señalización por Orexinas.	[218]
25.	DKK-3	<i>H. sapiens</i>	(136-157)	Proapoptótico	Asociación en retículo endoplásmico (RE), y relación con la apoptosis inducida por estrés.	[219]
26.	Proteína L2	<i>Human Papillomavirus</i>	CTD (445-467)	Cápsida	Participación en el ciclo infeccioso. También DYNLT3.	[220, 221]
27.	Nucleoporins	Mammals	Repeticiones FG	Estructural	Estructuración del complejo del poro nuclear.	[222]
28.	CT850	<i>Chlamydia trachomatis</i>	340-360		Localización de <i>C. trachomatis</i> al MTOC.	[223]
29.	VP26	Herpes simplex virus		Proteína de la cápsida	Asociación con el transporte axonal. También DYNLT1.	[224, 225]
30.	SATB1	<i>H. sapiens</i>	Nt-domain (1-346)	Factor de transcripción	Acumulación nuclear y modulación de la expresión génica.	[226]
31.	Bub3	<i>M. musculus</i>	Nt-domain(1-166)	Proteína del SAC	Progresión de la mitosis.	[114]

**Tabla 4.4:** Recopilación de los ligandos de la familia DYNLT (DYNLT1/Tctex1 y DYNLT3/RP3). **Abbrv:** CTD, dominio C-terminal (de *C-terminus Domain*); CTRS, señal de localización y retención citoplasmática (de *Cytoplasmic Targeting/Retention Signal*); Ig, inmunoglobulina).

### 4.3.3. Funciones de DYNLT

Poco después de su descubrimiento como producto del *locus* del Complejo *t*, se confirmó que era una LC, un componente estructural de las dineínas [174, 175]. Tanto DYNLT1 como DYNLT3 pueden formar parte del motor de dineína, pero de forma excluyente [183], donde tienen, en principio, una función estructural, compartida con las dineínas flagelares [175] y con la dineína del transporte intraflagelar [227].

#### Localización subcelular

Sin embargo, DYNLT1 podía existir en poblaciones subcelulares independientes a la dineína, y por tanto, tener funciones no relacionadas con el transporte microtubular. En general, durante la interfase, tanto DYNLT1 como DYNLT3 tienen una distribución celular dispersa, punteada por todo el citosol, que tiende a acumularse en una localización yuxtannuclear [192], correspondiente al centrosoma y al aparato de Golgi [113]. También se ve en un anillo perinnuclear, probablemente derivado de su interacción con las nucleoporinas [222], y en algunas células se encuentra abundantemente dentro del núcleo. Pero a lo largo del ciclo celular, DYNLT puede redistribuirse a estructuras determinadas en cada fase. Puede encontrarse como componente del huso mitótico, donde podría participar en su ensamblaje u orientación [113], el surco de escisión o los cinetócoros, donde DYNLT1 [228] y DYNLT3 [229] contribuyen al correcto alineamiento de los cromosomas.

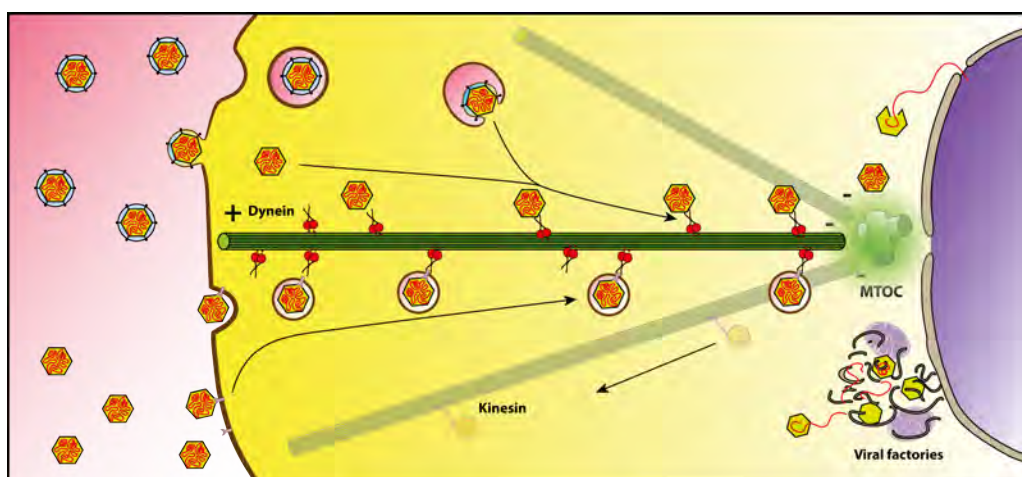
En el núcleo, DYNLT3, gracias a su interacción con el factor de transcripción asociado a la matriz nuclear (SATB1) juega un papel en la regulación de la expresión génica [226], en la mitosis [114] y en la meiosis [230].

#### Transporte microtubular

Como parte del motor de la dineína, siempre se ha asignado a las LCs una función adaptadora, es decir, para anclar proteínas a las dineínas para ser transportadas. El caso mejor caracterizado es el de la rodopsina en las células fotorreceptoras, un GPCR que corresponde al 95 % del total de proteína en los discos apilados del segmento exterior de los bastones, en la retina. La tasa de recambio de estos discos es muy alta, y hay un intenso tráfico de vesículas cargadas con rodopsina, que actúa como receptor de las dineínas mediante su asociación a DYNLT1 [196], que se ve distorsionado por la sobre-expresión del homólogo DYNLT3, que no es capaz de unir a la rodopsina y desplaza a DYNLT1 de las dineínas. Del mismo modo, este transporte está regulado por fosforilación, de tal forma que la fosforilación en la serina Ser82 tras el transporte permitiría la disociación entre DYNLT1 y la dineína, liberándose a su vez la rodopsina [231]. Como en otros casos, este modelo significaría que DYNLT1 es capaz de unir simultáneamente a la dineína y a la rodopsina, pero esto no ha sido demostrado todavía.

Relacionado con el transporte de proteínas celulares está la implicación de DYNLT1 y las dineínas en la infección vírica [104], donde se ha propuesto que DYNLT1 actúa como receptor para asociar la entrada y transporte del virus al motor de la dineína. En general, los virus deben alcanzar el núcleo de

forma activa, porque la viscosidad del citosol y el empaquetamiento molecular impide una difusión efectiva. Esto es aún más importante en los virus neurotróficos que tienen que desplazarse grandes distancias por las largas prolongaciones neuronales desde los puntos de entrada en los extremos hacia el soma. Para ello explotan la maquinaria de transporte celular. Este es el caso de virus como el Herpes simplex [224], y en distancias más cortas, los papilomavirus [221]. Otra forma de invasión es el reclutamiento de los motores mediante sus receptores en las vesículas endocíticas, como se ha propuesto para los poliovirus [199]. En el caso de los retrovirus, la poliproteína Gag parece ser reclutada activamente a los centrosomas, localizados perinuclearmente, gracias a una señal de localización reconocida por DYNLT1 [212], donde es procesada para continuar el ciclo del virus. Sin embargo, otras veces, como se ha visto para flavivirus, la interacción con las LCs parece actuar en fases más tardías de la infección sin participación de la actividad motora, colaborando con el ensamblaje de las partículas víricas [217].



**Figura 4.15:** Participación de las dineínas y otros motores en la infección vírica. Tomada de [104].

### Función neuronal

Dada la importancia del citoesqueleto microtubular en la organización de las neuronas, no es sorprendente encontrar que DYNLT1 tenga una gran importancia en estas células, y se le asocian algunas funciones, tanto dependientes como independientes del motor neuronal, así como relacionadas con situaciones patológicas, como infecciones víricas.

Desde el principio se ha visto una mayor expresión de DYNLT1 en tejidos neuronales, sobre todo en células proliferativas, y de hecho ha sido descrito como un marcador selectivo de los progenitores neuronales [232], donde se ha visto que es un inhibidor de la diferenciación neuronal, manteniendo a las células radiales de la zona subventricular como precursores indiferenciados [213]. En este sentido, DYNLT1 participa en la señalización por las GPCR mediante su interacción con las subunidades G $\beta$  [211], que también están implicadas en la orientación del huso mitótico y la neurogénesis de forma independiente de las dineínas. La estimulación de una GPCR produce la activación de las proteínas G asociadas, i. e. las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se disocian, y así G $\beta$ , entre sus funciones, puede secuestrar a

DYNLT1, desestructurando el complejo que mantiene inactivo a Lfc [233]. En este proceso también interviene la fosforilación, tanto de Lfc como de DYNLT1, que en su posición T94 regula su asociación a la DIC, y eliminaría el freno a la progresión de la diferenciación [234]. Además, también se ha visto una interacción entre DYNLT1 y los receptores de neurotrofinas Trk, implicadas activamente en la regulación de los procesos de diferenciación neuronal. De esta forma, DYNLT1 participa en la regulación de la señalización celular mediante el control de la disponibilidad de los elementos implicados.

Alternativamente, DYNLT1 está relacionada con la neuritogénesis y el crecimiento axonal [215, 235]. Una vez las células están destinadas a la diferenciación neuronal, DYNLT1 puede promover la formación de prolongaciones neuronales de fenotipo axonal, participando en el equilibrio entre las GTPasas Rho y Rac, y la interconexión entre el citoesqueleto de actina y los microtúbulos en la elongación de las neuritas.

### **Ensamblaje de la dineína**

La interacción de DYNLT1 cercana a DYNLL1 sobre la cadena intermedia implica directamente a las proteínas DYNLT en la estructuración del complejo de la dineína. De hecho, ambas cadenas ligeras colaboran mutuamente en esta tarea. Se ha calculado que la unión de una de las cadenas ligeras aumenta la afinidad del segundo dímero en unas 50 veces, por un efecto de divalencia que disminuye las restricciones entrópicas [189]. La asociación de las cadenas ligeras permite el alineamiento de los sitios de unión de otras proteínas divalentes, como DYNLRB hacia el lado C-terminal, o la propia dinactina en el extremo N-terminal, para contribuir al ensamblaje del subcomplejo adaptador, y su asociación, también divalente, a las cadenas pesadas para montar el complejo de la dineína.

### **Fosforilación de DYNLT1**

En la secuencia de DYNLT1 se han identificado algunas regiones que pueden ser potencialmente fosforiladas. El principal punto de fosforilación y regulación de DYNLT1 parece ser la posición T94 (pT94, T92 en *D. melanogaster*), que regula varios procesos en los que participa DYNLT1. Lo más inmediato de DYNLT1(pT94) es la disociación de la DIC manteniendo el estado dimérico [236], que podría conllevar la desestructuración del complejo y la activación de las funciones independientes de la dineína.

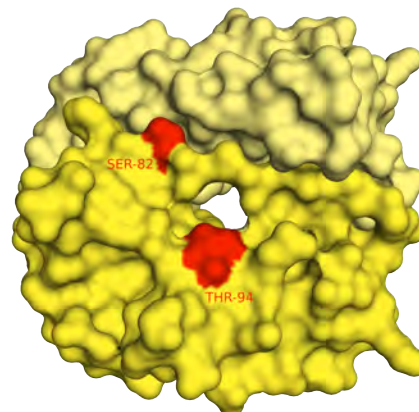
Puede apreciarse en la figura 4.16 que los residuos que hasta la fecha han sido identificados como dianas de fosforilación, están en posiciones exteriores, accesibles a la acción de las quinasas.

### **Secuencia consenso de unión a DYNLT1**

Uno de los datos más buscados en el estudio de las LCs es la determinación de la secuencia consenso, una secuencia que, presente en las proteínas, permita predecir su interacción con DYNLT1. En el caso de DYNLL1, todas las proteínas caen en dos tipos de secuencias, y un tercer tipo más

(a) Fosforilación de DYNLT1 y sus efectos.

Residuo	Kinasa	Efecto
<i>T4</i>	FynK	Desconocido [192].
<i>S82 (S80)</i>	MPKK	Disociación de DIC, mientras mantiene su asociación a rodopsina [231].
<i>T94 (T92)</i>	PKC	Disociación de DIC [235, 236]; Disociación de Lfc [214].



(b)

**Figura 4.16:** Fosforilación de DYNLT1. a) La posición del aminoácido está indicada sobre DYNLT1 de mamíferos, y entre paréntesis, el residuo homólogo en *D. melanogaster*; b) Representación tridimensional de los residuos susceptibles de fosforilación sobre la superficie de la proteína DYNLT1.

divergente, secuencias fácilmente identificables (ver la sección 4.1.2). Sin embargo, los esfuerzos realizados sobre DYNLT1 han sido más infructuosos, los datos estructurales de interacciones son más escasos, restringidos únicamente a un par de cristales con DIC. Numerosos trabajos tratan de acotar la interacción a las secuencias mínimas, pero al alinear las regiones descritas, se ve que hay escasa similitud entre ellas, y los datos son algunas veces contradictorios. Se recopilan en la tabla 4.5 las secuencias de las proteínas que se asocian a DYNLT1.

Los primeros estudios estructurales con DYNLT1 y su interacción con DIC determinaron por RMN una secuencia polibásica en el inicio Nt de la zona de interacción como posible consenso ( $-[K/R]-[K/R]xx[K/R]-$ ), que era compartida por varios ligandos y producía alteraciones detectables en los espectros de RMN de DYNLT1 [161], sobre todo en la zona periférica del surco, y en la región del lazo entre las cadenas  $\beta 2$  y  $\beta 3$ . Sin embargo, en las estructuras cristalográficas posteriores esta secuencia no formaba parte de los mapas de densidad electrónicos detectados y no era necesaria para la interacción con el que se considera el ligando canónico DIC [72].

Otros estudios posteriores, ésta vez con la proteína Lfc (una GEF de Rho, descrita más adelante), cuya secuencia no tiene ninguna homología con las ICs, también detectan unas interacciones adventicias, fuera de los canales hidrófobos [214], lo que podría representar un modo de interacción diferente. Aún así, no se ha terminado de descartar la importancia de esta secuencia básica en las interacciones entre DYNLT1 y otras proteínas, incluso en la posibilidad de distribuir las interacciones IC:DYNLT1:cargo en diferentes superficies de DYNLT1, estableciendo a su vez las diferencias entre DYNLT1 y DYNLT3 que podrían unir la misma dineína pero diferente cargamento [188].

##	Ligando	Secuencia
1.	<i>mDYNC111</i>	GRRLHKLGVSKVTQVDFPPREV
2.	<i>mDYNC112</i>	GRGPIKLGMAKITQVDFLPREIV
3.	<i>dmCdic</i>	KKQPLNLSVYNVQATNIPPKETL
4.	<i>hp59<sup>FynK</sup> (1-19)</i>	MGCVQCKDKEATKLT-EERDG
5.	<i>tcp59<sup>FynK</sup> (1-19)</i>	MGCVQCKDKETTKTTVEERAG
6.	<i>CD5cyt (403-495)</i>	KKLVKKFRQKKQRQWIGPTGMNQNMFSHRNHTATVRSHAENPTASHVDNEYSQPPRNSHLSAYPA- LEGALHRSSMQPDNSSDSYDLHGAQRL
7.	<i>Doc2 (1-32)</i>	MRGRRGDRMTINIQEHMAINVCPIRPIRQI
8.	<i>Rodopsina (310-348)</i>	NKQFRNCMLTTICCGKNPLGDDEASATVSKTETSQVAPA*
9.	<i>RagA (50-70)</i>	VRFLGNLVLNLWDCGGQDTFM
10.	<i>TrkA (462-484)</i>	MTLGGSSLSPTTEGKGSGLQGHI
11.	<i>CD155 (368-417)</i>	SKCSREVLWHCHLCPSSTEHASASANGHVSYSAVSRENSSSQDPQTEGTR
12.	<i>BMPR-II (509-529)</i>	RMAELMMIWERNKSVSPTVNPMTAMQNER
13.	<i>PTH/PTHr (478-511)</i>	LALDFKRKARSGSSSYSGPMVSHTSVTNVGPR
14.	<i>HspB9 (47-159)</i>	NDHARDGFQMKLDAHGFAPPELVVQVDGQWLMVTGQQQLDVRDPERVSYRMSQKVHRKMLPSNLS- PTAMTCCLTPSGQLWVRGQCVALALPEAQTGPSRLGSLGSKASNLTR
15.	<i>Ca<sup>2+</sup>Ch (2018-2097)</i>	MAHESGLKESPSWVTQRAQEMFQKTGTWSPEQGPPTDMPNSQPNSQSVEMREMGRDGYSDSEHYL PMEGQGRAASMPRL
16.	<i>Supervillin (411-440)</i>	STRNRLDMRQRRMNARYQTQPVTLGEVEQV
17.	<i>Gprotβ</i>	GRIQMRTTRTLRGHLAKIY
18.	<i>Flavivirus M (1-20)</i>	SLTVQTHGESTLANKKGAWM
19.	<i>Lfc (135-160)</i>	LLGSRRGLSSLAKSVSTTNIAGHN
20.	<i>Rab3D (74-95)</i>	QIWDTAGQERYRTITTAYYRGA
21.	<i>Receptor de orexinas (361-425)</i>	LSGKFREQFKAAFSCLPLGPGSLKAPSPRSSASHKSLSLQSRCSISKISEHVVLTSVTTVLP

**Tabla 4.5:** Secuencias de las proteínas que interaccionan con DYNLT1. Se muestran aquellas proteínas cuya región de interacción se ha acotado a un tamaño razonable en el respectivo estudio. El asterisco indica el final real de la proteína.

En la actualidad, aunque se han realizado numerosos estudios estructurales, sólo se han publicado estructuras de DYNLT1 en interacción con la DIC (ver Tabla 4.3), lo que dificulta sustancialmente la identificación de los motivos, tanto secuenciales como estructurales, necesarios para una unión de DYNLT1, más aún cuando la mayor parte de los análisis secuenciales le dan la mayor importancia a la secuencia -RRxxR-, que no está presente en los cristales. Con todo, las mutaciones realizadas en este segmento alteran sustancialmente la interacción, como se demostró con PTH-R [206] o con la subunidad G $\beta$  [211], sugiriendo que esta secuencia puede dirigir la interacción de las proteínas con una región con carga negativa de DYNLT1 para orientar y favorecer la formación de los complejos superiores.

En las estructuras depositadas, el segmento de DIC se inserta como una hebra extendida en el surco hidrófobo, extendiendo la lámina formada e interaccionando directamente con la cadena intercambiada ( $\beta$ 2) con la que establece una serie de puentes de hidrógeno intercatenarios. Destaca la distorsión de la cadena  $\beta$  que sufre la DIC (Fig. 4.14b), en el que se ha modificado el patrón normal de los puentes de hidrógeno intercatenarios por la inserción de un aminoácido extra [72, 189]. Esta situación podría permitir una mayor variabilidad, si cabe, en las secuencias de reconocimiento porque permitiría incorporar aminoácidos extra que no forman parte estrictamente de una cadena  $\beta$  extendida.

## 4.4. Proteínas que interaccionan con DYNLT1

Durante el desarrollo experimental de esta Tesis, se analizaron las proteínas que interaccionan con las cadenas ligeras descritas en la bibliografía, y entre ellas, algunas fueron seleccionadas para profundizar en los estudios sobre su estructura y secuencia. Además del ligando establecido como canónico, la cadena intermedia de dineína, se estudiaron con más detalle las GTPasas RagA y Rab3D y la RhoGEF Lfc.

### GTPasas pequeñas moleculares

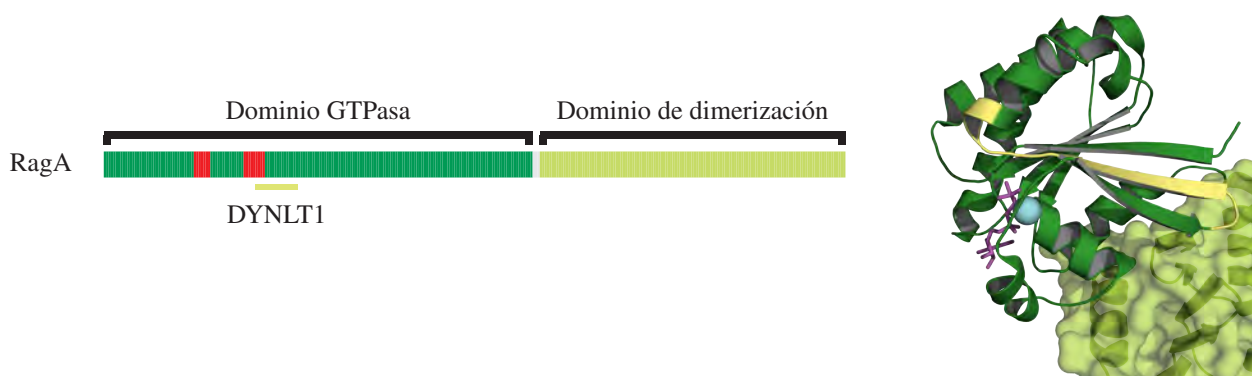
Las GTPasas son interruptores moleculares que participan en la señalización celular. Son enzimas que ciclan entre un estado activo, con GTP unido, y un estado inactivo en el que han hidrolizado el GTP y mantienen asociado el GDP, funcionando como interruptores, que integran estímulos para dirigir una respuesta celular. Cuando tienen GTP unido están en un estado activo, mientras que con GDP unido, pasan a un estado inactivo. Tienen una actividad catalítica de hidrólisis del GTP intrínseca muy lenta, que para llevarse a cabo necesita la participación de las enzimas proteína activadora de la actividad GTPasa (*GTPase Activating Protein*, GAP), que hidroliza el GTP a GDP y produce su inactivación, y el cierre de la ruta. Para activarse, el GDP debe sustituirse por GTP gracias a los factores de intercambio GEF.

Durante el ciclo de activación, la acción de las GTPasas las llevan a cabo interaccionando con sus efectores, ya sea para dirigirlos a las localizaciones celulares adecuadas o para activar una función enzimática.

Hay descritas dos pequeñas GTPasas que interaccionan directamente con DYNLT1, RagA ( $\equiv$  FIP-1) [197] y Rab3D [216].

**RRAG A** (*Ras-related GTP-binding protein A*,  $\equiv$  RagA) es una GTPasa peculiar en la familia, pues es la única que es dimérica (Fig. 4.17). En humanos hay cuatro miembros, que heterodimerizan (RagA/B + RagC/D), y están implicadas en el control del crecimiento celular mediado por los complejos mTORC1/2, y regulado por la disponibilidad de aminoácidos.

Como GTPasa, tienen una estructura global común a la familia, pero tienen como particularidades un dominio de dimerización para formar las parejas, y la ausencia de motivos de lipidación para dirigir su anclaje a la membrana. En el dímero, el estado nucleotídico de ambos componentes controla el nivel de actividad global. De esta forma, la mayor actividad se consigue con el monómero A/B ocupado con GTP, y el monómero C/D ocupado con GDP (RagA<sup>GTP</sup>-RagC<sup>GDP</sup>), siendo la forma RagA/B<sup>GTP</sup>-RagC/D<sup>GTP</sup> menos activa, y si ambos están ocupados con GDP, la GTPasa está inactiva.



**Figura 4.17:** RagA es una GTPasa particular. Además del dominio G, con sus características típicas (unión del nucleótido, regiones *Switch* I y II) tiene un dominio C-terminal implicado en la heterodimerización con RagC/D. A diferencia de otras GTPasas, RagA carece de sitios de acilación.

Los complejos mTORC1/2 integran señales desde varias rutas, que incluyen estrés, factores de crecimiento, estado energético y disponibilidad de aminoácidos, para producir diversos efectos relacionados con el crecimiento celular y la supervivencia mediante el control de la síntesis de proteínas [237].

RagA es capaz de unirse a la proteína Ragulator, de forma independiente de aminoácidos gracias a su dominio de dimerización, mientras que se asocia a Raptor, y por extensión a mTORC, de forma dependiente de los aminoácidos. En respuesta a la disponibilidad de aminoácidos, RagA<sup>GTP</sup>/C<sup>GDP</sup> se mantiene activo, y se recluta todo el complejo sobre las membranas de los lisosomas, donde mTORC es activado por las GTPasas Rheb, y su actividad kinasa fosforila proteínas clave de la síntesis de proteínas para reprimir las rutas lisosomales o de la autofagia. Por otra parte, la falta de aminoácidos inhibe este complejo, y se activan los mecanismos de supervivencia, como la autofagia.

Se describió la interacción entre DYNLT1 y RagA en el contexto de la infección por adenovirus, ya que RagA ( $\equiv$  FIP-1) actuaba de conector entre proteínas del virus y DYNLT1 formando un complejo



ternario [197], lo que podría servir de conexión entre los adenovirus y la maquinaria de transporte.

**Rab3D** es una GTPasa perteneciente a la extensa subfamilia de GTPasas de tipo Rab (*Ras-like in brain*), implicadas en el tráfico vesicular, tanto en el direccionamiento de las vesículas como en la fusión de las membranas. Las Rab3 participan en la ruta exocítica, en células con una alta tasa de secreción, y particularmente Rab3D, en la regulación de los pasos después de la TGN de células no neuronales.

La GTPasa Rab3D tiene una estructura típica con los motivos habituales, y está bien conservada entre organismos, aunque difiere un poco con respecto al resto de las proteínas de la subfamilia Rab [238]. Contiene en su extremo C-terminal el motivo de para la isoprenilación, las regiones *Switch* I y II que cambian de conformación según la ocupación del sitio del nucleótido, y, dentro de las características de la subfamilia, secuencias particulares para sus efectos específicos.



**Figura 4.18:** Estructura de Rab3D. En rojo se indican las regiones *Switch* I y II. En amarillo se indica la región de interacción de Tctex1 descrita [216]. †: Sitios de isoprenilación. PDB ID: 2GF9.

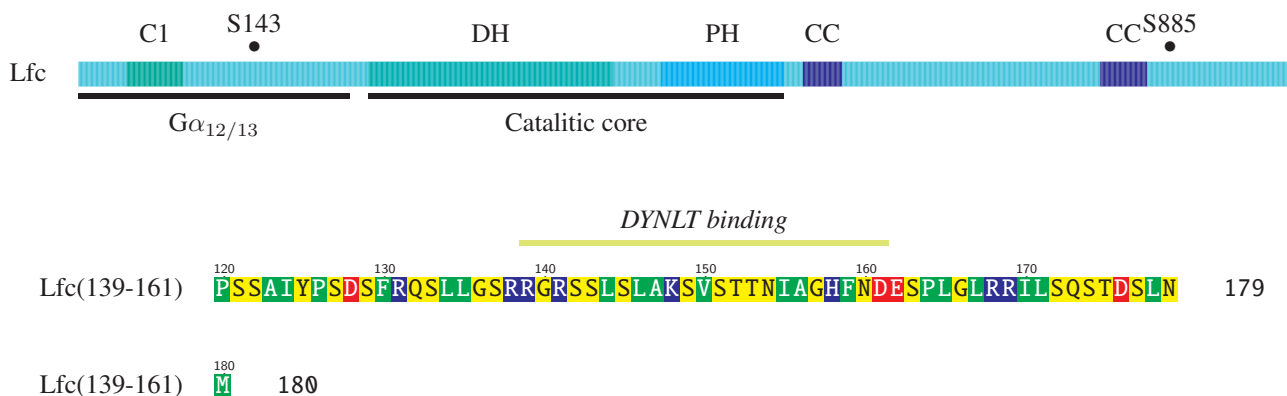
Como interruptor, Rab3D cicla entre un estado activo (Rab3D<sup>GTP</sup>) y un estado inactivo (Rab3D<sup>GDP</sup>). Cuando está en estado inactivo, se asocia a la membrana de origen de una vesícula, donde una GEF la activa, y dirige la formación de la vesícula y su transporte hacia el compartimento objetivo. Allí, una GAP estimula su actividad GTPasa para pasar nuevamente al estado inactivo, cuando una proteína inhibidora de la disociación (*GTPase Dissociation Inhibitor*, GDI) la disocia de la membrana y la mantiene en el citosol en este estado inactivo, lista para empezar un nuevo ciclo.

Se describió la interacción entre DYNLT1 y Rab3D en células osteoclasticas, donde Rab3D actúa en el tráfico de las vesículas entre el aparato de Golgi y los bordes ondulados [216]. La interacción no tiene una función claramente establecida, pero podría servir para reclutar a la dineína para el transporte de las vesículas de reabsorción ósea.

## Lfc

Lfc (de *Lbl first cousin*  $\equiv$  ARHGEF2, GEF-H1) es una GEF de las GTPasas de la familia Rho (*Ras homologous*), que participan en el control de la reestructuración del citoesqueleto para diferentes procesos, como la movilidad y adhesión celular o el tráfico vesicular [239]. En la comunicación entre el citoesqueleto de actina y los microtúbulos, RhoA y Rac1 mantienen una actividad antagónica dependiente de los ciclos de polimerización/despolimerización de los microtúbulos. El crecimiento

de los microtúbulos activa a Rac1 a la vez que mantienen a RhoA inactivo para inducir la formación de lamelipodios, mientras que la despolimerización de los microtúbulos inhibe a Rac1 y activa a RhoA para la formación de fibras de estrés [214]. La alteración de este equilibrio puede conllevar la inducción de tumores.



**Figura 4.19:** Distribución de dominios de Lfc. ●: sitios de fosforilación. C1: Dominio conservado con la proteína quinasa C1 (PKC1); DH: Dominio de homología a Dbl; PH: Dominio de homología a pleckstrina; CC: Región que adquiere estructura helicoidal implicada en la dimerización. Se amplía la región identificada para la interacción con Tctex1, que cae en una zona de Lfc intrínsecamente desordenada, con los residuos coloreados según el índice de hidropatía[153].

La proteína Lfc actúa como activador de RhoA para la estimulación del citoesqueleto de actina en respuesta a la despolimerización de los microtúbulos. Lfc se mantiene inhibida gracias a su asociación a los microtúbulos. En los precursores neuronales de la zona subventricular, Lfc interviene en la señalización Rho para dirigir la reorientación del plano de división, y así fomentar la diferenciación a neuronas, y para ello controla la coordinación de los microtúbulos del huso mitótico con la actina cortical. Lfc/GEF-H1 es una proteína con numerosos dominios, pero carece del dominio RH típico de las RhoGEFs (4.19). Los dominios DH y PH (dominios de homología a Dbl y a pleckstrina, respectivamente), conforman el núcleo catalítico, que se une a las GTPasas inactivas ( $\text{Rho}^{\text{GDP}}$ ) para favorecer el intercambio del GDP por GTP y activarla.

La interacción entre DYNLT1 y Lfc se describió como el mecanismo que dirigía el acoplamiento de Lfc a los microtúbulos y su consiguiente inhibición [214], demostrando que Lfc quedaba asociado a los microtúbulos de forma dependiente de las dineínas mediante la formación de un complejo ternario entre Lfc, DYNLT1 y la DIC. De esta forma se ha implicado directamente a DYNLT1 en la regulación de la actividad de Lfc, y por extensión, del sistema RhoA/Rac1 para la coordinación de los dos sistemas citoesqueléticos. DYNLT1 mantiene a Lfc inhibida por su asociación a los microtúbulos a través de la dineína. Señales extracelulares, como el ácido lisofosfatídico (LPA) mediante su GPCR, inducen la señalización intracelular a través de sus proteínas G acopladas que pueden activar a Lfc de varias formas conjuntas: por un lado, las subunidades  $\text{G}\alpha$  (particularmente  $\text{G}\alpha_{12/13}$ ) se asocian a Lfc en su región Nt, y probablemente por competición con DYNLT1, liberan a Lfc del complejo microtubular; por otro lado, las subunidades  $\text{G}\beta\gamma$  podrían competir con DYNLT1 por su unión a DIC

[211], con el mismo efecto de liberar a Lfc de la retención al citoesqueleto [233].

# Objetivos

Históricamente, el grupo del Dr. J. Ignacio Rodríguez Crespo ha estado trabajando en diferentes aspectos de las óxido nítrico sintasas y la biología del óxido nítrico. Entre otros, sus trabajos permitieron caracterizar la acilación de las NOSs, como la palmitoilación de iNOS [28], la interacción de eNOS con membranas [22], el efecto del •NO sobre la expresión de proteínas [36], la fosforilación de eNOS y los efectos en su actividad [240] o la interacción al extremo C-terminal de la iNOS a través de sus motivos de unión a dominios PDZ [26, 27]. También demostraron la participación del •NO en la activación de factores de transcripción sensibles a gases diatómicos [37].

La nNOS es la principal fuente de •NO en células neuronales y musculares. El dominio PDZ de la nNOS le sirve para ser reclutada en localizaciones subcelulares, donde entra a formar parte de los complejos de señalización y respuesta a estímulos extracelulares, donde el •NO juega un papel modulador. Aunque se estableció que la secuencia de este dominio PDZ es un motivo proteico de unión a dominio PDZ de tipo III, muchas otras secuencias de otros tipos pueden interaccionar con él, teniendo una versatilidad de unión excepcional. Debido a que no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares de la unión al dominio PDZ de la nNOS se planteó un estudio pormenorizado del dominio y sus interacciones.

Otro bloque importante de la trayectoria del grupo es el trabajo con la cadena ligera de dineínas DYNLL1, en la que se han invertido más de 15 años. Aunque este polipéptido se describió como PIN, una molécula inhibidora de la actividad de la nNOS [241]. Los estudios realizados por el Dr. Rodríguez Crespo demostraron que la unión de DYNLL1 a nNOS promueve la homodimerización de esta última y no inhibe su actividad de síntesis de •NO [17]. Del mismo modo, se encontraron nuevas secuencias peptídicas, tanto de origen celular como viral, capaces de asociarse a DYNLL1 [242], y se identificaron las secuencias consenso de unión a DYNLL1 (-[R/K]-STQT- y -GIQVDR- [155]). Esto llevó a poder predecir y demostrar la interacción de DYNLL1 a nuevas proteínas [243], lo que llevó a la caracterización de la interacción entre DYNLL1 y el canal de glutamato GRINL1 [244] y el factor de transcripción ATMIN [245], así como proteínas virales, como la proteína p54 del virus de la peste porcina africana (*African Swine Fever Virus*, ASFV) [246, 247], permitiendo a su vez una caracterización estructural de estas interacciones [248]

Tal y como se ha comentado anteriormente, el homodímero de DYNLT se une a los residuos -SKVTQVDFL- (aminoácidos 131-139 de la secuencia de DYNC111 de *M. musculus*), mientras que el homodímero de DYNLL se une a los residuos -SKETQTP- (147-153), enfrentando dos polipéptidos

paralelos de la cadena intermedia de dineína y manteniéndolos juntos. De esta manera, DYNLT1 y DYNLL1 pasan a formar parte del motor de dineína y aparecen asociados a la fracción microtubular en fraccionamientos subcelulares. Por otro lado, tanto el homodímero de DYNLT como el de DYNLL pueden aparecer de forma libre en el citosol sin formar parte de los microtúbulos. En este último caso, probablemente funcionen como grapas celulares capaces de estabilizar estructuras diméricas en un proceso regulado por fosforilación-desfosforilación.

A día de hoy existe abundante información acerca de las propiedades de DYNLL1 como proteína capaz de asociarse a numerosas proteínas celulares y virales [104], como línea de trabajo adicional se planteó la caracterización del funcionamiento de DYNLT1, la otra cadena ligera.

Así pues, se abarcaron varios temas para el trabajo a realizar durante esta Tesis. En la parte de trabajos sobre la nNOS se plantearon los siguientes objetivos:

1. Caracterizar bioquímicamente la interacción del PDZ de la nNOS con las proteínas
2. Identificar estructuralmente aminoácidos importantes para dirigir la interacción del dominio PDZ con sus ligandos.
3. Esclarecer los requerimientos secuenciales de los ligandos del dominio PDZ de la nNOS.
4. Identificar y caracterizar nuevas proteínas que puedan unirse al dominio PDZ de la nNOS.

En el bloque de experimentos con las cadenas ligeras, se plantearon los objetivos siguientes:

1. Caracterizar las interacciones entre DYNLT1 y los ligandos descritos, particularmente la DIC.
2. Identificar un patrón para definir las interacciones.
3. Profundizar en la interacción entre DYNLT1 y las GTPasas.
4. Identificar

# **Parte II**

## **Resultados**



## Capítulo 5

# Interacción de péptidos Ct con el dominio PDZ de la nNOS

El dominio PDZ de la nNOS sigue manteniéndose elusivo a los intentos de definir los mecanismos moleculares que controlan la gran variedad y versatilidad de sus ligandos proteicos. Estudios iniciales ya identificaron que el dominio PDZ de la nNOS reconocía PBMs de tipo III. Los trabajos de David Bredt y colaboradores determinaron mediante una librería peptídica la secuencia C-terminal -GDAV\* como consenso para la unión al PDZ de la nNOS, una secuencia que, de hecho, no existe en el extremo C-terminal de ninguna proteína conocida [50]. La hipótesis de que este dominio PDZ tiene preferencia por las secuencias de tipo III se vio reforzada por la descripción aún más tarde de las interacciones con el receptor de melatonina [52], la subunidad  $\alpha 1$  del receptor adrenérgico [48], la palmitoil transferasa DHHC23/NIDD [58] o la proteína de unión a carboxilos-terminales (*C-terminal Binding Protein*, CtBP) [57], todos ellos con secuencias de este tipo. Sin embargo, la interacción mejor caracterizada es la que se da con la proteína NOS1AP/CAPON [51], detectada a partir de una genoteca de cerebro humano por medio de barridos por dobles híbridos de levadura. Esta proteína posee en su extremo C-terminal una secuencia de tipo II, que presenta un residuo ácido en la posición -3 mientras la posición -2 está ocupada por un aminoácido hidrofóbico (-EIAV\*). La unión del dominio PDZ de la nNOS a proteínas con secuencias de tipo II también ha sido propuesto anteriormente para el caso de la proteína Vac14. Más aún, también se ha descrito la interacción de este dominio PDZ con proteínas que tienen una clara secuencia de tipo I en sus extremos, tales como la ATPasa dependiente de calcio (*Plasma Membrane Calcium/calmodulin-dependent calcium ATPase*, PMCA-4b) [56], el receptor 2B de serotonina [55] y el receptor de tipo tirosín-fosfatasa ICA-512 [54]. Este comportamiento tan dispar en cuanto a la unión de secuencias C-terminales por parte del dominio PDZ de la nNOS, así como la imposibilidad de predecir un comportamiento claro han llevado a iniciar un análisis sistemático de las interacciones descritas en la bibliografía para definir las bases moleculares de la amplia especificidad de unión del dominio PDZ de la nNOS.

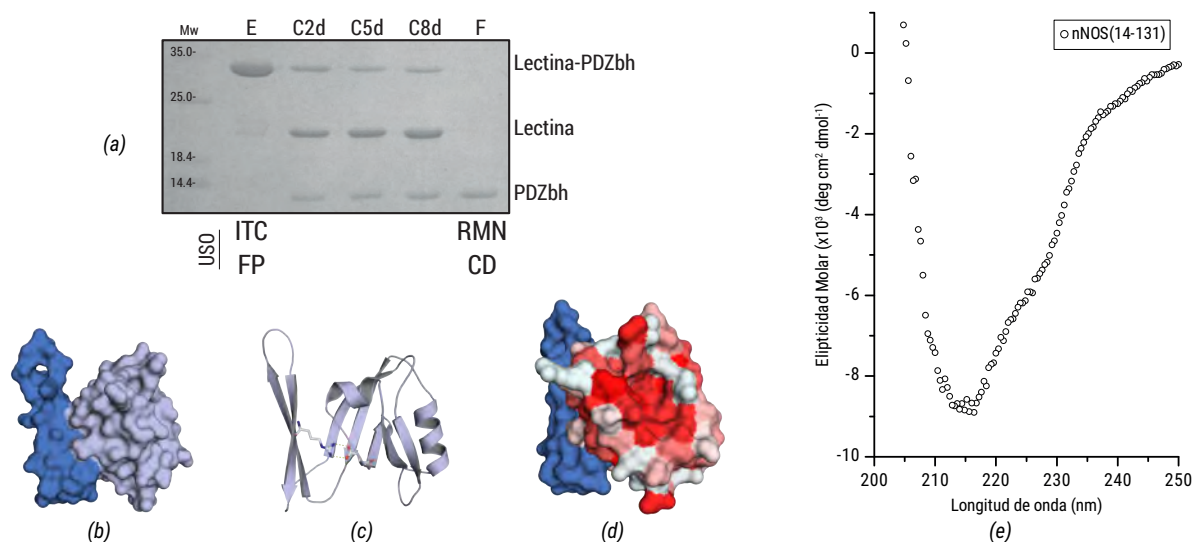




## 5.1. Expresión recombinante del dominio PDZ de la nNOS

El estudio funcional y estructural del dominio PDZ de la nNOS *in vitro* ha sido posible gracias a la posibilidad de clonarlo y expresarlo de manera recombinante. Después de probar varias construcciones y varios *tags* de fusión se obtuvo un constructo correspondiente al fragmento N-terminal de la nNOS, denominado PDZ $\beta$ h, que incluye el dominio PDZ (posiciones 14 a 100) seguido de la horquilla  $\beta$  (101 a 131).

En general, durante el transcurso de esta Tesis se utilizó un plásmido para la expresión recombinante en bacterias, conteniendo el fragmento 14-131 de la nNOS fusionado al extremo C-terminal de la lectina del hongo *Laetiporus sulphureus* para su purificación por cromatografía de afinidad en una columna de Sefarosa 4B. Un sitio de corte de la proteasa del virus del grabado del tabaco (*Tobacco Etch Virus*, TEV) permite la eliminación de este *tag*. Fue imposible producir fragmentos recombinantes más cortos porque la eliminación de los aminoácidos correspondientes a la horquilla  $\beta$  dieron lugar a una proteína de muy baja solubilidad que se acumulaba en cuerpos de inclusión en las bacterias.













**Figura 5.1:** Purificación de la construcción de nNOS(14-131) para los experimentos realizados *in vitro*. (a) Proceso de la purificación seguido por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. El extracto bacteriano se pasa por una columna de Sefarosa 4B, donde se retiene con altísima selectividad la construcción lectina-PDZ. La elución con 200 mM de lactosa permite la obtención de una solución muy pura de la proteína retenida. Se añade la proteasa del TEV para desprender el *tag* lectina del dominio PDZ, y un nuevo paso por una columna de sefarosa retiene a la lectina, obteniéndose el PDZ $\beta$ h puro. **E:** Elución directa de la columna de sefarosa; **C:** Periodo de incubación con la TEVp, en días; **F:** PDZ $\beta$ h puro. (b) Representación de la superficie molecular de la proteína PDZ $\beta$ h expresada. En azul fuerte está representada la horquilla  $\beta$ . (c) Misma proteína mostrando los elementos de estructura secundaria y el detalle del puente de hidrógeno entre el Asp62 y la Arg121 que estabiliza la formación de la horquilla  $\beta$ . (d) Detalle del bolsillo hidrofóbico del sitio de unión de los péptidos, coloreado según el índice de hidrofobicidad siendo el rojo más hidrofóbico. (e) Espectro de dicroísmo circular de la construcción nNOS(14-131), mostrando una proteína perfectamente plegada.

En la figura 5.1 se describe el proceso de la expresión del PDZ hasta la obtención de las dos especies utilizadas en los experimentos: la forma completamente purificada en la que se ha digerido y eliminado el *tag* de lectina, y la forma intermedia con la lectina fusionada. Para comprobar el correcto

plegamiento de la proteína tras el proceso de purificación, se realizó un espectro de dicroísmo circular (*Circular Dichroism*, CD) (Fig. 5.1e). La deconvolución del espectro permite una estimación de estructura secundaria de hélice  $\alpha$  y lámina  $\beta$  muy cercanos a los valores teóricos obtenidos a partir de las estructuras cristalográficas. La proteína digerida y completamente purificada es una versión más fisiológica, pero más laboriosa de obtener, y la falta de aminoácidos aromáticos hacen complicada su detección y caracterización espectrofotométrica. Por ello, para algunos de los experimentos de calorimetría isoterma de titulación (*Isothermal Titration Calorimetry*, ITC) y las medidas de polarización de fluorescencia (*Fluorescence Polarization*, FP), se utilizó la proteína recombinante lectina-PDZ $\beta$ h, en el paso de la purificación previo a la eliminación del tag. Esto se comentará con detalle más adelante.

## 5.2. Interacción del dominio PDZ de la nNOS con péptidos C-terminales

Como se comentó anteriormente, el grupo de David Bredt utilizó una librería de unos 13000 millones de péptidos C-terminales no predefinida para identificar en 1997 la secuencia que mejor se acomodaba en el bolsillo de interacción del dominio PDZ de la nNOS. En este trabajo, determinaron que la posición 0 era fundamentalmente ocupada por valina, un residuo habitual entre los ligandos de dominios PDZ, mientras que en la posición -2 aparecía preferentemente el ácido aspártico. Esta distribución de aminoácidos llevó a la propuesta de que el dominio PDZ de la nNOS reconoce PBMs de tipo III, un tipo de reconocimiento novedoso hasta ese momento. Entre las más de 100 secuencias C-terminales que se unían con alta afinidad obtenidas en esta librería se encontraron motivos del tipo -GGGDVV\*, -GGGDWV\*, -GGGDAV\* o -GGGDPV\*, lo que sugería claramente que el surco de reconocimiento del dominio PDZ de la nNOS selecciona preferentemente los tres últimos aminoácidos de sus proteínas diana.

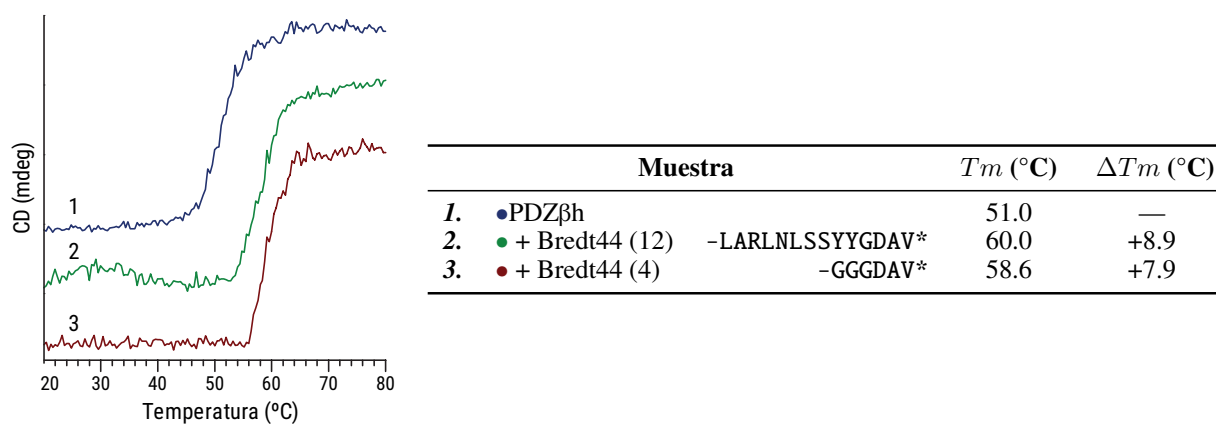
##	Péptido	Secuencia	His	$\beta$ -galatosidasa			
				Azul	10 min	20 m	30 m
1.	Bredt44	-ARLNLSSYYGDAV*	++	++			
2.	Bredt123	-DRLRN RVHGDAV*	++	++			
3.	Bredt161	-IGKSCYGDAV*	++	++			
4.	No relacionado		-	-	—	—	

**Tabla 5.1:** Interacción de péptidos Bredt (44, 123 y 161) por doble híbrido de levadura. Se fusionaron las secuencias indicadas mediante la hibridación de nucleótidos a continuación del plásmido pGBT9, y se cotransformaron las levaduras con el dominio PDZ en el plásmido pGAD. Para cada péptido se indica el resultado del crecimiento de las levaduras en ausencia de histidina y la producción del precipitado azul por la  $\beta$ -galactosidasa. Todos los resultados con los péptidos de Bredt indican complementación, y por tanto interacción.

Teniendo en cuenta estos estudios se seleccionaron tres de los péptidos descritos, todos ellos con constantes de unión elevadas, y fueron denominadas siguiendo la misma numeración propuesta,

Bredt44, -123 y -161 [50]. Las secuencias específicas, todas ellas PBMs de tipo III, se representan en la tabla 5.1. Como primera aproximación, se confirmó la interacción de estos tres péptidos en ensayos de doble híbrido de levadura. Estos resultados indican que el dominio PDZ de la nNOS se asocia a péptidos C-terminales que poseen un residuo de ácido aspártico en posición -2 y un residuo de valina en posición 0 (Tabla 5.1).

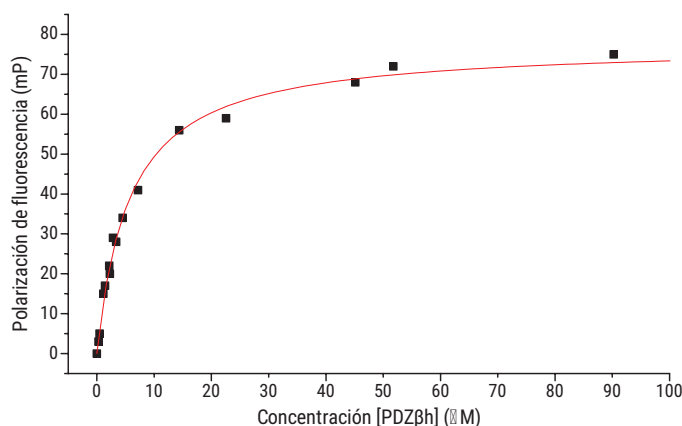
En el caso particular de los péptidos de Bredt cabe destacar fuerte interacción detectada por esta técnica. Habitualmente, las interacciones positivas producen la expresión intracelular de la  $\beta$ -galactosidasa, la cual se detecta por la adición del 5-Br-4-Cl-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal) y la aparición del precipitado azul en un plazo de unos 30 minutos, requiriéndose de tiempos mayores si la interacción en cuestión es más débil. Sin embargo, los péptidos analizados aquí, seleccionados artificialmente mediante técnicas de afinidad, muestran una interacción por doble híbrido tal que hacen que se detecte el precipitado azul en los primeros 10 minutos. Aunque el ensayo en papel mostrado no es estrictamente cuantitativo, esta observación hace pensar que la afinidad de la interacción entre los péptidos Bredt44, Bredt123 y Bredt161 y el dominio PDZ de la nNOS es de alta afinidad (ver más adelante).



**Figura 5.2:** Desnaturalización térmica de nNOS(14-131) ausencia o en presencia de dos péptidos con PBMs de tipo III. Se analiza el cambio de la señal de dicróismo circular a 222 nm inducido por el aumento de la temperatura, y se recogen en la tabla los valores de  $T_m$  (punto medio del cambio) y variación de la  $T_m$  con respecto al PDZ vacío. En todos los casos, el PDZ está a una concentración de 20  $\mu$ M, en tampón HBS y pH 7, y los péptidos son añadidos a 500  $\mu$ M de concentración final.

A continuación se procedió a analizar la unión de un péptido con un PBM de tipo III al dominio PDZ de la nNOS por medio de medidas de dicróismo circular. Para ello se analizó la curva de desnaturalización del dominio PDZ de la nNOS en ausencia y en presencia del péptido Bredt44 (Fig. 5.2). Las curvas de desnaturalización térmica del dominio PDZ muestran cómo la proteína recombinante nNOS(14-131) transita de forma cooperativa y muestra un valor de  $T_m$  de 51.0 °C. Sin embargo, la unión de Bredt44 produce un cambio sustancial en la temperatura necesaria para desnaturalizar a la proteína. La magnitud del desplazamiento (+8.9 °C) sugiere nuevamente una interacción fuerte. Es destacable que no se aprecien grandes diferencias entre Bredt44 (de 12 aminoácidos) y un péptido de 6 residuos que con la secuencia -GGGDAV\*. La similitud en los valores de  $T_m$  en presencia de

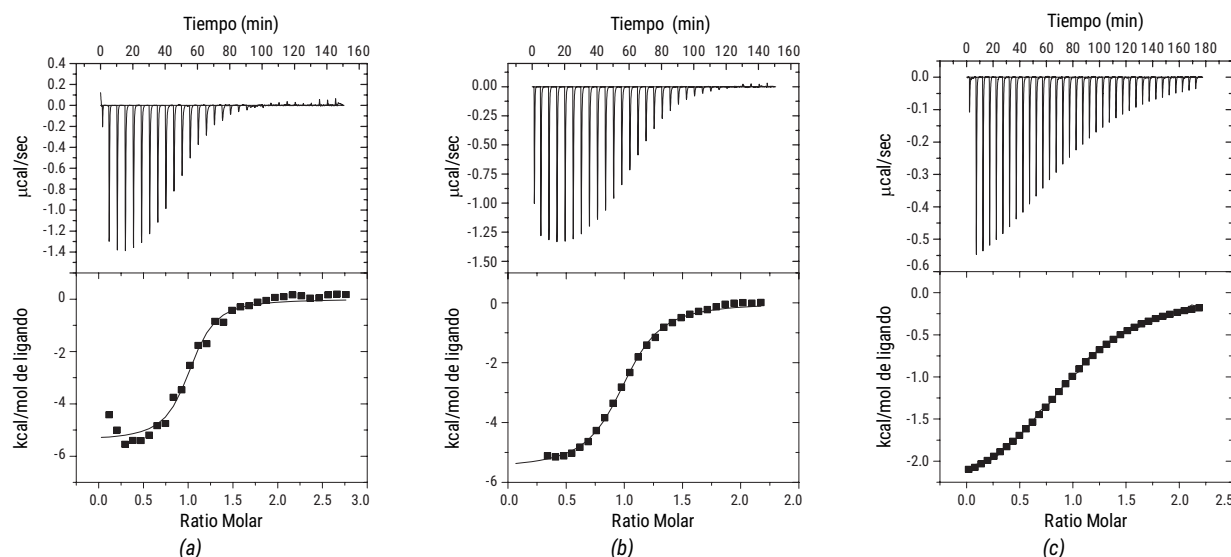
cualquiera de ambos péptidos (menos de un grado de diferencia entre ambos) parece indicar que las mayores contribuciones a la asociación dominio PDZ-péptido están mediadas por los cuatro últimos aminoácidos de éste, los cuales parecen ser suficientes para establecer la interacción. Por otro lado, tal y como se verá más adelante, Se puede afirmar que por medio de experimentos de desnaturalización térmica monitorizados a 222 nm es posible, de una manera muy efectiva, determinar la unión del dominio PDZ de la nNOS a péptidos C-terminales, si bien de un modo más cualitativo que cuantitativo. Este último aspecto se comentará en detalle posteriormente.



**Figura 5.3:** Cambios en la FP del péptido Bredt123 marcado con FITC en su extremo N-terminal. En este ensayo, el péptido se mantiene a concentración constante (100 nM) mientras se añade una concentración creciente del PDZβh. La formación de un complejo más grande reduce la movilidad del fluoróforo y aumenta su polarización. El ajuste de los datos obtenidos a una hipérbola permite obtener el punto medio de saturación ( $K_d$ ) y el valor de polarización máxima. La constante de disociación obtenida para Bredt123 es  $K_d = 5,69 \pm 0,28 \mu\text{M}$ .

Para profundizar en las características termodinámicas de la interacción entre el dominio PDZ de la nNOS y péptidos PBM de tipo III se analizó la unión del péptido Bredt123 marcado con FITC en su extremo N-terminal al dominio PDZ de la nNOS utilizando técnicas de FP (Fig. 5.3). Se ha seleccionado este péptido debido a su mejor solubilidad en comparación con Bredt44 o Bredt161. En estos ensayos se tituló la construcción lectina-PDZβh sobre una cantidad constante del péptido Bredt123 (100 nM) y los valores de FP del FITC frente a la concentración de proteína se ajustaron a un modelo hiperbólico, tal y como se describe en los Materiales y Métodos en la Pag. 159. De esta manera es posible extraer los parámetros de polarización máxima y constante de disociación ( $K_d$ ). Tal y como muestra la figura, las medidas de FP del péptido conjugado con FITC al unirse al dominio PDZ trazan a una curva hiperbólica de saturación (ver ecuación 10.15) que proporciona una constante de disociación de  $K_d = 5,69 \pm 0,28 \mu\text{M}$ .

La evaluación termodinámica de la interacción mediante calorimetría isoterma de titulación del péptido Bredt44 (-RLNLSYYGDAV\*) permite a su vez determinar una interacción equivalente entre los dos péptidos y el dominio PDZ de la nNOS, con una constante de disociación en el mismo orden de magnitud ( $\approx 5$  vs  $\approx 2 \mu\text{M}$ ). En la figura 5.4 se comparan también las dos proteínas utilizadas en los estudios *in vitro*, el dominio PDZ de la nNOS habiéndole eliminado o no el tag de lectina. Como se puede ver en la tabla 5.2, las diferencias entre ambas especies es despreciable, por lo que se realizaron



**Figura 5.4:** Isotermas de titulación representativas de la unión del dominio PDZ de la nNOS a péptidos PBM tipo III. (a) Bretdt44 de 11 aminoácidos (-RLNLSYYGDAV\*) titulado sobre -PDZβh. (b) Bretdt44 sobre lectina-PDZβh. (c) Bretdt44 de 4 aminoácidos (-GGGDAV\*) sobre lectina-PDZβh. Bretdt44 (11) es más afín, probablemente derivado de interacciones accesorias con los aminoácidos adicionales

los experimentos con la proteína sin cortar, menos laboriosa de obtener.

Péptido	$K_a$ ( $M^{-1}$ )	$K_d$ ( $\mu M$ )	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (cal/molK)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
Bretdt44(12) <sup>†</sup>	$7.39 \cdot 10^5$	1.32	-8.041	-5.400	8.86	-2.641
Bretdt44(12)	$4.49 \cdot 10^5$	2.23	-7.773	-5.533	7.137	-2.197
Bretdt44(4)	$6.50 \cdot 10^4$	15.4	-6.542	-2.457	13.8	-4.117

**Tabla 5.2:** Recopilación de los datos termodinámicos obtenidos por ITC con los péptidos de Bretdt44 de 11 y 4 aminoácidos.

<sup>†</sup> Experimento realizado con la proteína cortada y llevada hasta el último paso de purificación. El resto fue realizado con la proteína lectina-PDZβh. En todos los casos, la concentración de proteína es de 45  $\mu M$ , y el péptido se titula a partir de una solución a 1 mM.















Al analizar el perfil termodinámico puede apreciarse que los aminoácidos más N-terminales de la secuencia parecen participar en la interacción y podrían contribuir a una asociación más fuerte, pues su eliminación se traduce en una menor afinidad y en un cambio del mecanismo de interacción (Fig. 7.2a), teniendo una mayor contribución entrópica. La extensión de aminoácidos podría establecer interacciones superficiales que de cuenta de la componente entálpica y favorezcan a una afinidad mayor, mientras que la inserción de un péptido más corto en el bolsillo hidrofóbico del PDZ implicaría exclusivamente la formación de interacciones hidrófobas, sin participación de enlaces polares específicos, lo que explicaría la mayor componente entrópica y la menor afinidad. Por ITC se obtiene una constante de disociación ligeramente menor (una mayor afinidad) que con la técnica de FP (2.23 vs 5.69  $\mu M$ ). Todos los datos correspondientes a las isotermas de unión están recopilados en la tabla 5.2.

Así, estos estudios confirman lo que había sido determinado por los trabajos previos de que la

secuencia terminal -GDAV\* es suficiente para dirigir una interacción con el PDZ de la nNOS. Los resultados de interacción aquí presentados, a su vez, validan estas aproximaciones experimentales como modelos de laboratorio en el estudio de la asociación al dominio PDZ, y ponen de manifiesto la posibilidad de la participación de las secciones localizadas hacia el lado N-terminal de los péptidos con potenciales roles en la unión al PDZ, al menos para los péptidos de este tipo, para los cuales la relevancia fisiológica de sus secuencias está aún por determinar.

### 5.3. Interacción del dominio PDZ de la nNOS con NOS1AP

Los trabajos anteriores, junto a los datos presentados en la sección anterior revelan una preferencia clara del dominio PDZ por péptidos que, debido a la presencia del residuo ácido en la posición -2, están englobados en el tipo III de PBM. Aunque la secuencia particular de estos péptidos no pertenece a ninguna proteína conocida, sí que hay proteínas con secuencias C-terminales de tipo III de los que se ha demostrado que tienen una interacción con el dominio PDZ de la nNOS (Tabla 2.1).

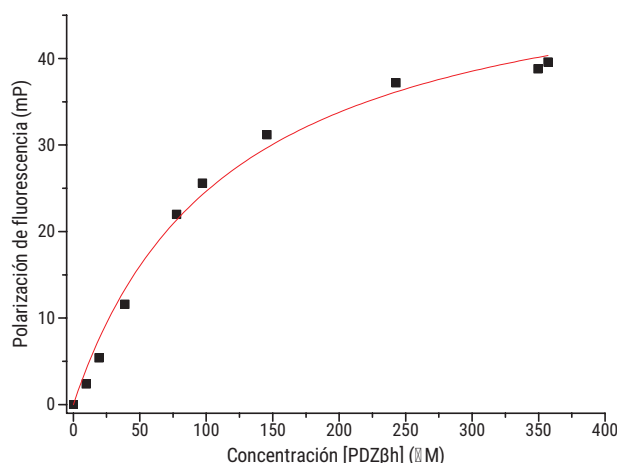
Péptido	Secuencia	X-Gal		
		His	30 m	2 h
1. NOS1AP <i>wt</i>	-ELGDSLDEIAV*	++		
2. NOS1AP Gly <sub>-9</sub> → Ala	-ELADSLDEIAV*	++		
3. NOS1AP Asp <sub>-8</sub> → Ala	-ELGASLDEIAV*	+		
4. NOS1AP Leu <sub>-6</sub> → Ala	-ELGDSADDEIAV*	-		
5. NOS1AP Ile <sub>-2</sub> → Ala	-ELGDSLDEIAAV*	++		
6. NOS1AP Val <sub>0</sub> → Ala	-ELGDSLDEIAA*	-		
7. Desmogleína	-SRITKYSTQYSK*	NC		

**Tabla 5.3:** Interacción del dominio PDZ de la nNOS con secuencias C-terminales de la proteína NOS1AP en doble híbrido de levadura. Para determinar la relevancia de los aminoácidos, se han mutado residuos seleccionados sobre la secuencia de NOS1AP abarcando hasta la posición -9. Específicamente, los aminoácidos Gly<sub>-9</sub>, Asp<sub>-8</sub>, Leu<sub>-6</sub>, Ile<sub>-2</sub> y Val<sub>0</sub> han sido sustituidos por alanina. Aunque a tiempo final (2 h) todos los positivos son iguales, a los 30 min del ensayo del X-Gal se puede apreciar una leve diferencia en la producción del precipitado azul entre la secuencia nativa y el mutante Asp<sub>-8</sub>. Se ha usado un péptido no relacionado (desmogleína) como control negativo.

Sin embargo, entre los ligandos reales más estudiados está la proteína NOS1 *Adaptor Protein* (NOS1AP)/*Carboxy-terminal PDZ ligand of nNOS* (CAPON) [51], que con la secuencia -EIAV\* pertenece al tipo II de motivos por tener un aminoácido hidrofóbico en la posición -2. Para continuar con la caracterización de las interacciones del dominio PDZ de la nNOS con ligandos reales, se siguió la misma metodología desarrollada en la sección anterior, esta vez con péptidos C-terminales derivados de NOS1AP. Se iniciaron los análisis con la aproximación del doble híbrido de levadura, para lo cual se clonaron los últimos 12 aminoácidos de la proteína NOS1AP en los plásmidos de transformación de levaduras, y sobre esta nativa se diseñaron un conjunto mutaciones puntuales, sustituyéndolos



por alanina que permitirán esclarecer la región mínima necesaria a nivel de aminoácidos para la interacción de NOS1AP. Se sustituyó la valina en posición 0 como control de pérdida de interacción, pues es un requisito indispensable para la inserción en el bolsillo hidrofóbico, lo que efectivamente es así en todas las réplicas realizadas. Sorprendentemente se encontró que la alteración de residuos internos, tan alejados del extremo C-terminal como Asp<sub>-8</sub> o Ile<sub>-6</sub> podían alterar o suprimir la interacción con el dominio PDZ de la nNOS (Tabla 5.3). Esto podría significar que están implicados en una superficie de interacción más grande o porque podrían estar implicados en un modo diferente de unión del péptido, situaciones posibles que ya han sido sugeridas en otros sistemas [60, 249].



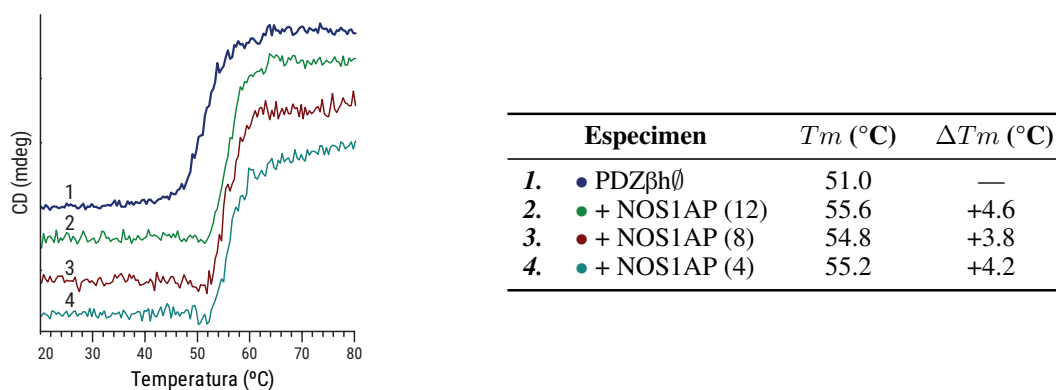
**Figura 5.5:** Polarización de la fluorescencia del FITC por la unión a un péptido derivado de NOS1AP (*f*-GDSLDDDEIAV\*). Se tituló con cantidades crecientes de lectina-PDZβh, sobre 100 nM del péptido fluorescente, y se obtiene una  $K_d = 117,44$  μM.

Como se puede ver, la sustitución de la valina del extremo C-terminal (Val<sub>0</sub>) y la isoleucina de la posición -6 (Ile<sub>-6</sub>) eliminan por completo la interacción, mientras que los otros aminoácidos no producen cambios detectables, salvo por la sustitución Asp<sub>-8</sub>→Ala afecta ligeramente a la unión, pues el precipitado azul tarda algo más de tiempo en aparecer (Tabla 5.3), aunque alcanza la misma intensidad de azul a tiempo final, lo que puede dar una idea de que la interacción de este mutante es posible pero menos favorecida. Con estos experimentos se pone de manifiesto la importancia de un aminoácido localizado hacia el interior de la secuencia, alejándose hasta seis residuos del extremo C-terminal, y abre la posibilidad de la proteína NOS1AP pueda estar interaccionando de forma adicional con una secuencia interna.

Se procedió entonces a determinar la afinidad de la interacción mediante la asociación de un péptido sintético derivado de NOS1AP conjugado con FITC, y analizar la curva de polarización de la fluorescencia. Se puede ver en la (Fig. 5.5) que la interacción del dominio PDZ de la nNOS con el péptido fluorescente es de muy baja afinidad, en contra de lo que podría esperarse después del resultado en las levaduras. En estas condiciones experimentales, se necesitó una concentración de 400 μM de PDZ para obtener una curva que permitiera un ajuste hiperbólico, lo que da lugar a una constante de disociación muy baja del orden de 100 μM. Como se ha visto en los dobles híbridos, la modificación de los aminoácidos tan internos como la Ile<sub>-6</sub> o el Asp<sub>-8</sub> producen una alteración de la



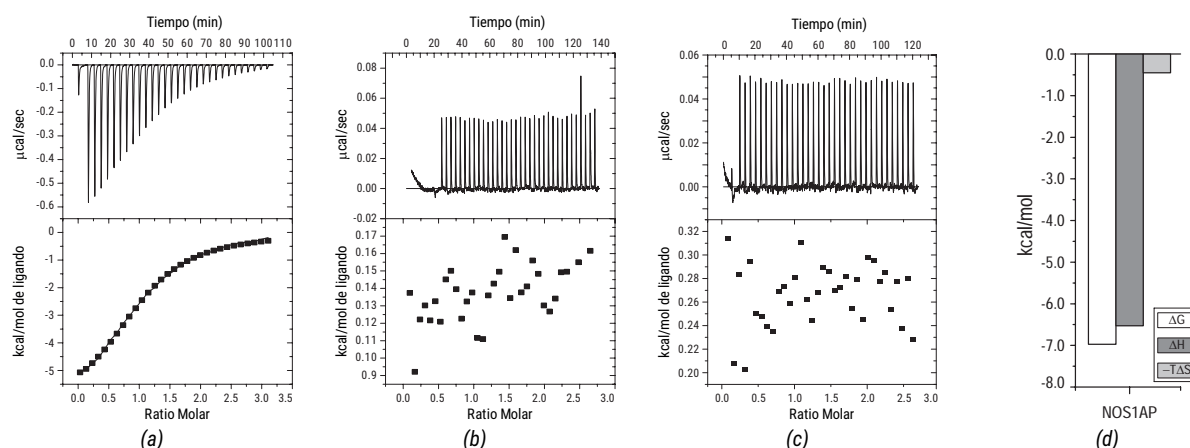
interacción. La presencia de una molécula grande como el FITC tan cercana en el extremo N-terminal del péptido (*f*-GDSLDDEIAV\*) podría ser la causa de que se detecte una constante de disociación tan baja al estar interfiriendo por efecto estérico con las regiones internas del péptido en su participación en el proceso de unión al PDZ. Para definir con precisión la necesidad de éstas secuencias internas se procedió a otras técnicas analíticas, como la variación de la  $T_m$  por CD o la ITC para así reducir las distorsiones experimentales y establecer la necesidad de estos residuos en la interacción con el dominio PDZ.



**Figura 5.6:** Variación de la  $T_m$  del dominio PDZ recombinante por la interacción con péptidos derivados de NOS1AP, medido por el cambio de la señal de dicroísmo circular a 222 nm. La eliminación de residuos internos de la proteína NOS1AP no produce variaciones en el desplazamiento de la  $T_m$  con respecto al péptido de 12 aminoácidos, produciendo todos ellos una estabilización de unos 4 °C. En todos los casos, el PDZ está a una concentración de 20  $\mu$ M, en tampón HBS y pH 7, y los péptidos son añadidos a 500  $\mu$ M de concentración final.

De este modo se expresó el dominio PDZ, se purificó hasta la eliminación total del *tag* de lectina y se midió la variación de su  $T_m$  por CD tras la interacción con los péptidos sintéticos con las secuencias C-terminales de NOS1AP, estudiando además diferentes longitudes peptídicas. En la figura 5.6 se muestra que los péptidos derivados de NOS1AP interaccionan con el dominio PDZ de la nNOS produciendo su estabilización al cambio conformacional inducido por la temperatura, aunque la variación de la  $T_m$  es menor que en el caso descrito anteriormente para Bredt44 (Fig. 5.2). Sorprendentemente, y en contra de lo esperado, no se detectan diferencias en este comportamiento con los péptidos mas cortos, lo que indica que todos ellos se unen al dominio PDZ y lo estabilizan. Debido a la discrepancia entre el ensayo del doble híbrido de levadura y la variación de las  $T_m$ , el análisis termodinámico en profundidad por calorimetría se hace aún más interesante. Se preparó entonces la proteína recombinante lectina-PDZ $\beta$ h para titular sobre ella los péptidos de NOS1AP de diferentes longitudes y estudiarlos por calorimetría de titulación.

Se puede ver claramente en la figura 5.7 cómo la eliminación de los aminoácidos N-terminales de la secuencia de NOS1AP hace que se pierda la interacción con el dominio PDZ, a pesar de lo que se ha podido describir con la técnica de la variación de la  $T_m$ . Sólo con la ausencia de los péptidos Gly<sub>-9</sub> y Asp<sub>-8</sub> se evita que la asociación del péptido al dominio PDZ sea detectada por calorimetría, revelando la importancia que pueden tener estos aminoácidos. Debido a que en el análisis por dicroísmo circular se enfrenta el dominio PDZ con concentraciones de hasta 1 mM de péptido, es posible que ésta sea



**Figura 5.7:** Experimentos de calorimetría representativos de los péptidos derivados de NOS1AP titulados sobre el dominio PDZ de la nNOS, mostrando en el panel superior el termograma y en el inferior la isoterma de unión. (a) NOS1AP de 12 aminoácidos (-ELGDSLDDDEIAV\*); (b) NOS1AP de 8 aminoácidos (-SLDDEIAV\*); (c) NOS1AP de 6 aminoácidos (-DDEIAV\*). La proteína se encuentra en la cámara de muestra a unos 50  $\mu\text{M}$ , mientras que los péptidos son inyectados a partir de una solución a 0.5 mM. Se puede ver que los péptidos cortos pierden por completo la interacción. (d) Perfil termodinámico de la asociación del péptido de NOS1AP.

una situación forzada, y que la técnica calorimétrica esté simplemente fuera del rango de sensibilidad para estas interacciones. Del mismo modo el péptido más corto también es incapaz de asociarse en estas las condiciones experimentales. Como se aprecia en la figura 5.7d, y se resume en la tabla a continuación, la interacción del péptido de NOS1AP tiene una componente entálpica muy importante, lo que sugiere la formación de enlaces polares específicos para dirigir la unión.

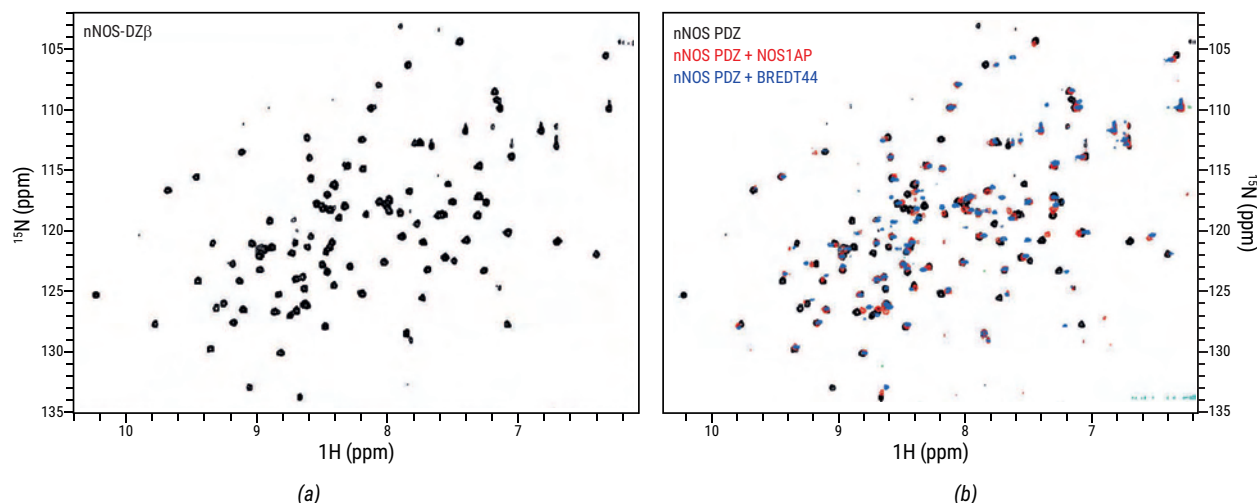
Péptido	$K_a$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (cal/molK)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
NOS1AP(12)	$1.29 \cdot 10^5$	7.75	-6.971	-6.524	1.5	-0.447

**Tabla 5.4:** Recopilación de los datos termodinámicos obtenidos por ITC con el péptido de NOS1AP -ELGDSLDDDEIAV\*. Los péptidos más cortos no dieron ningún calor de interacción, por lo que no pudo extraerse un perfil. 0.5 mM de péptido se inyectaron sobre 50  $\mu\text{M}$  del dominio PDZ.

## 5.4. Análisis estructural del dominio PDZ de la nNOS por RMN

Finalmente, se procedió a caracterizar estructuralmente el modo de unión de las secuencias C-terminales de los péptidos descritos anteriormente al dominio PDZ de la nNOS, utilizando para ello la espectroscopía de RMN. Con este fin, se produjo el dominio PDZ $\beta\text{h}$  como proteína recombinante en bacterias crecidas con medio mínimo para incorporar el isótopo  $^{15}\text{N}$ , y llevando la purificación hasta la obtención del dominio PDZ con elevada pureza, habiéndole eliminado por completo el *tag* de lectina.

Para empezar con los análisis, primero se procedió a la adquisición del espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC del PDZ en su estado libre, sin ningún péptido asociado, para confirmar el adecuado plegamiento de la



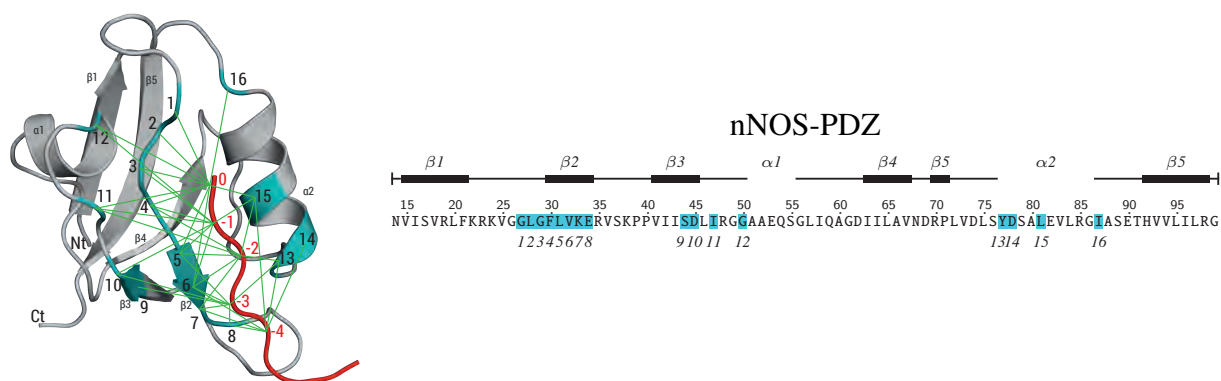
**Figura 5.8:** Espectros  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de la construcción recombinante del dominio PDZ de la nNOS (nNOS 14-131) en su estado libre (a) y en complejo con los péptidos NOS1AP (rojo) y Bredt44 (azul), comparados con el dominio PDZ libre (b).

proteína recombinante (Fig. 5.8a). Como era de esperar, el espectro muestra una buena dispersión de las señales, correspondiente a una proteína ordenada con una estructura tridimensional definida. Además, la alta proporción de estructura en lámina  $\beta$  favorece la precisión de las señales. La asignación de las señales del espectro de *Apo*-PDZ $\beta$ h se determinó en base a los datos ya publicados [250]. Para confirmar estas asignaciones se llevaron a cabo además experimentos 2D-TOCSY, 2D-NOESY y 3D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-NOESY (datos no mostrados).

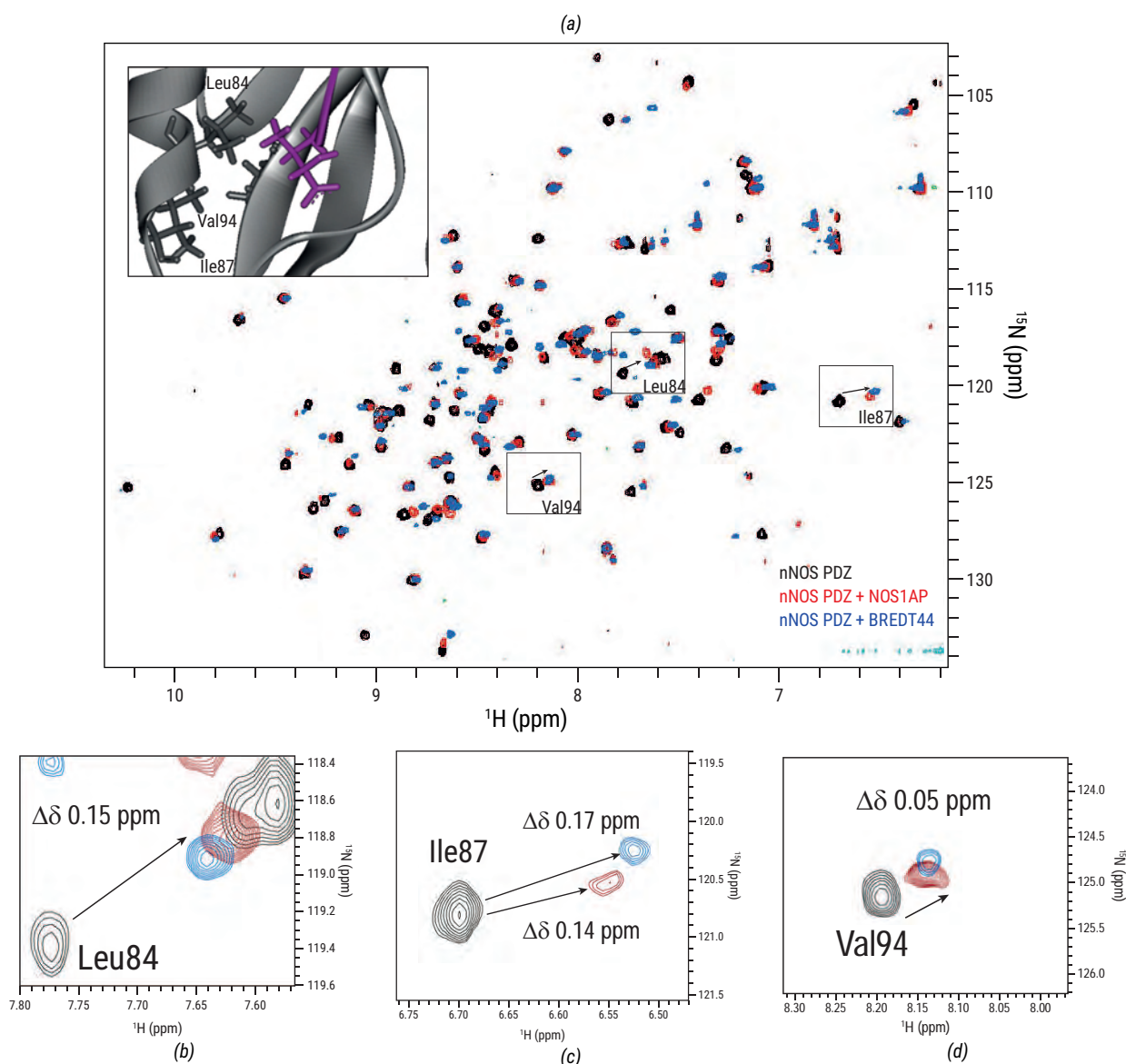
Una vez que la proteína recombinante fue caracterizada por RMN en su estado libre se analizó el comportamiento del PDZ de la nNOS en presencia de los dos péptidos ya estudiados hasta ahora, Bredt44 como representante del tipo III y NOS1AP como miembro de la clase II, el primero con un residuo ácido en la posición -2 y el segundo con el aminoácido hidrofóbico en la posición -2 y un ácido en la posición -3.

En la figura 5.9 se representa un esquema de las interacciones más probables que pueden establecer los aminoácidos de un dominio PDZ cuando acoge péptidos correspondientes a una extremo C-terminal [251], representados sobre un dominio PDZ genérico (en este caso, la  $\alpha$ 1-sintrofina), pudiéndose contar hasta 38 posibles interacciones entre el dominio PDZ y el ligando peptídico. Adaptando los aminoácidos del dominio PDZ implicados sobre la secuencia de la nNOS se obtienen una serie de posiciones que pueden servir de guía para los análisis de los espectro de RMN. Se identifican claramente los residuos que siguen al lazo -GLGF-, ya que forman la hebra  $\beta$  que recibirá al péptido entrante, pero también se se señala el inicio de la hélice  $\alpha$ 2, uno de los sitios clave para el reconocimiento del péptido.

El espectro HSQC del dominio PDZ libre, comparado con los espectros de la proteína unida a los péptidos Bredt44 (azul) y NOS1AP (rojo) se muestran en la figura 5.8b.



**Figura 5.9:** Esquema de las interacciones de un dominio PDZ. (a) Aminoácidos que forman las interacciones directas más probables (líneas verdes) con cualquiera de los aminoácidos del extremo C-terminal del péptido entrante (rojo). (b) Por comparación se han identificado y marcado los mismos aminoácidos sobre la secuencia del dominio PDZ de la nNOS. Adaptado de [251].

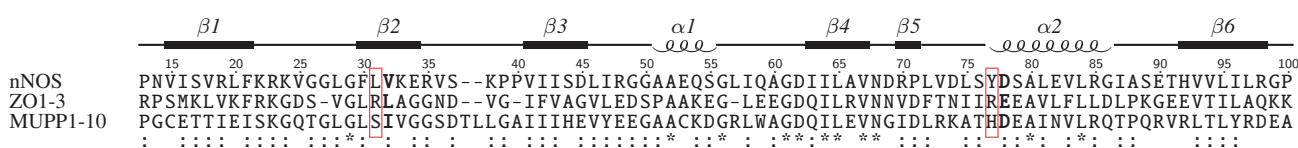


**Figura 5.10:** Perturbaciones del espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC del dominio PDZ de la nNOS tras la adición de los péptidos Bredt44 (azul) y NOS1AP (rojo). Se muestran los cambios en los desplazamientos químicos de los aminoácidos del bolsillo hidrofóbico Leu84 (a), Ile87 (b) y Val94 (c).

Ambos péptidos analizados tienen una valina en posición 0, cumpliendo el requisito indispensable de tener en esta posición un aminoácido hidrófobo que se acomoda en la cavidad hidrofóbica mientras es estabilizado por los puentes de hidrógeno que establece con el esqueleto peptídico del lazo -GLGF-, a través del grupo carboxilato del extremo. En el caso del dominio PDZ de la nNOS, el canal hidrofóbico sobre el que se asienta el péptido está formado por una serie de residuos altamente conservados: Leu28, Phe30, Val32 (en la cadena  $\beta 2$ ) y Leu84, Ile 87 y Val94 (en el bucle entre la hélice  $\alpha 2$  y la hebra  $\beta 5$ ). Se puede ver en la figura 5.10 las perturbaciones en las señales de los desplazamientos químicos del esqueleto peptídico de los aminoácidos Leu84, Ile87 y Val94 que son causadas por la unión de los péptidos, y en ambos casos hay una perturbación similar, de tal forma que, a pesar de la escasa homología de sus secuencias, ambos péptidos son insertados de la misma forma, alojando la valina del extremo C-terminal en el bolsillo hidrofóbico.

#### 5.4.1. Identificación de residuos implicados en el reconocimiento de la posición -2

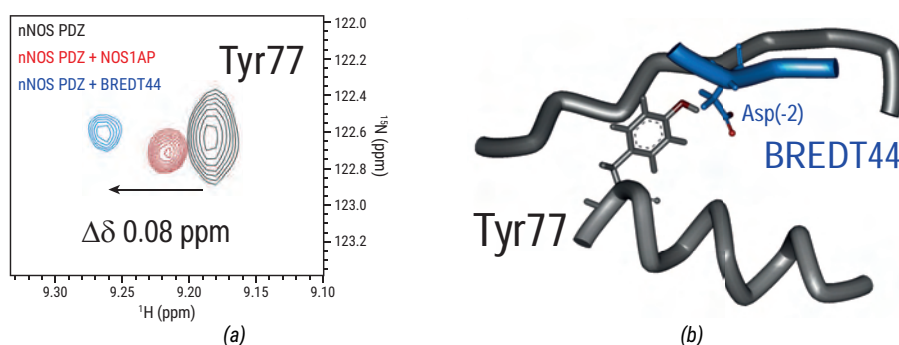
A continuación se trató de definir qué residuos del dominio PDZ de la nNOS son los responsables de permitir a la nNOS su doble especificidad hacia los dos tipos secuencias, es decir, cuáles son los aminoácidos que reconocen específicamente el residuo ácido de la posición -2 o -3, y permiten la asociación de ambos motivos. En general, como se pudo ver en la figura 2.1, el primer aminoácido de la hélice  $\alpha 2$  ( $\alpha 2$ -1) y el inicio de la hebra  $\beta 2$  (habitualmente el aminoácido  $\beta 2$ -2) suelen ser los que enlazan de forma específica al residuo en posición -2, así que se comparó la secuencia del dominio PDZ de la nNOS con otros dominios PDZs que reconocen motivos de tipo III cuya estructura es conocida, como el dominio PDZ3 de la proteína de la *Zonula Occludens* ZO1, y el PDZ10 de la MUPP1, y se buscaron específicamente estas posiciones



**Figura 5.11:** Comparación de las secuencias del dominio PDZ de la nNOS con la de otros dominios PDZ de estructura tridimensional conocida, que unen PBM de tipo III. El dominio PDZ 3 de la proteína ZO1 (*Zonula occludens 1*) puede reconocer un péptido C-terminal con la secuencia -WFSDWL\* [252]; MUPP1 (*Multiple PDZ Protein 1*) reconoce al extremo C-terminal de la claudina-1 (-SSGKDYV\*). En ambos casos se recuadran los residuos implicados en el reconocimiento de la cadena lateral del residuo ácido en la posición -2. La numeración corresponde a la nNOS de *R. norvegicus*.

En la proteína ZO1, estas posiciones están ocupadas por dos argininas (Arg436 y 480, Fig. 5.11), que estarían en una posición óptima para permitir la formación de puentes salinos con el Asp<sub>-2</sub>, sin embargo la arginina en la hélice  $\alpha A$  su vez, la proteína MUPP1 tiene una serina en  $\beta 2$ -2 y una histidina en  $\alpha 2$ -1 que estabilizan el carboxilato del aspártico en -2 del péptido a través de puentes de hidrógeno. Sin embargo, el PDZ de la nNOS contiene en estas posiciones clave una leucina (Leu31) en

$\beta$ 2-2 y una tirosina (Tyr77) en  $\alpha$ 2-1. En la estructura en solución por RMN del PDZ con la secuencia C-terminal del receptor de melatonina (-KVDSV\*) puede verse que el grupo hidroxilo de la cadena lateral de Tyr77 forma un puente de hidrógeno con el grupo carboxilato del Asp<sub>-2</sub>, por lo que cabría esperar que esta Tyr77 favorecería la interacción de péptidos C-terminales con ácidos en -2. Al titular el dominio PDZ de la nNOS con el péptido Bredt44, se pudo ver en los espectros  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC que, efectivamente, la unión de este péptido produce un cambio del desplazamiento químico de la tirosina 77, perturbación que se da con menos intensidad tras la adición del péptido de NOS1AP. El gran cambio del desplazamiento químico de la Tyr77 tras la adición de Bredt44 podría indicar la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de este aminoácido y el carboxilato del Asp<sub>-2</sub> del péptido.



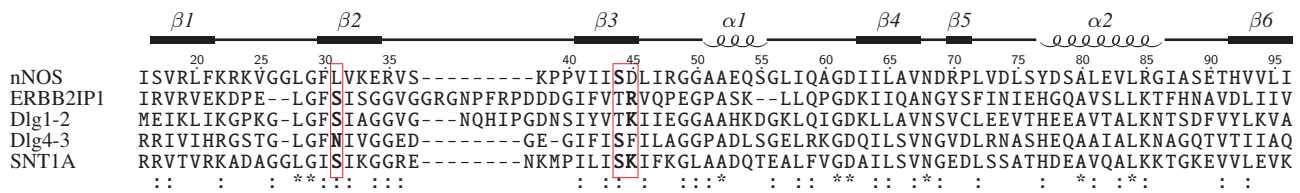
**Figura 5.12:** (a) Perturbación de la señal del desplazamiento químico de la tirosina 77 (Tyr77) del dominio PDZ de la nNOS en su estado libre (negro) y en presencia de los péptidos Bredt44 (azul) y NOS1AP (rojo). (b) Representación tridimensional de la posición de la cadena lateral de Tyr77 en las proximidades del carboxilato de la cadena lateral del Asp(-2) del péptido de Bredt44 (-RLNLSSYYGDAV\*).

### 5.4.2. Identificación de residuos implicados en el reconocimiento de la posición -3

En segundo lugar, se comparó el dominio PDZ de la nNOS con dominios PDZ de proteínas que reconocen secuencias que tengan un grupo ácido en la posición -3 (Fig. 5.13). En estos casos, la mayor parte de los dominios PDZ que establecen interacciones con el ácido en -3 lo hacen por un mecanismo similar. En el lado opuesto a la hélice  $\alpha$ 2 se localiza la hebra  $\beta$ 2, que forma una lámina  $\beta$  con  $\beta$ 3, la cual es extendida con la inserción del ligando. En estas dos cadenas, todos estos dominios tienen una pareja de aminoácidos que colaboran para reconocer y enlazar el ácido en -3 del péptido ligando.

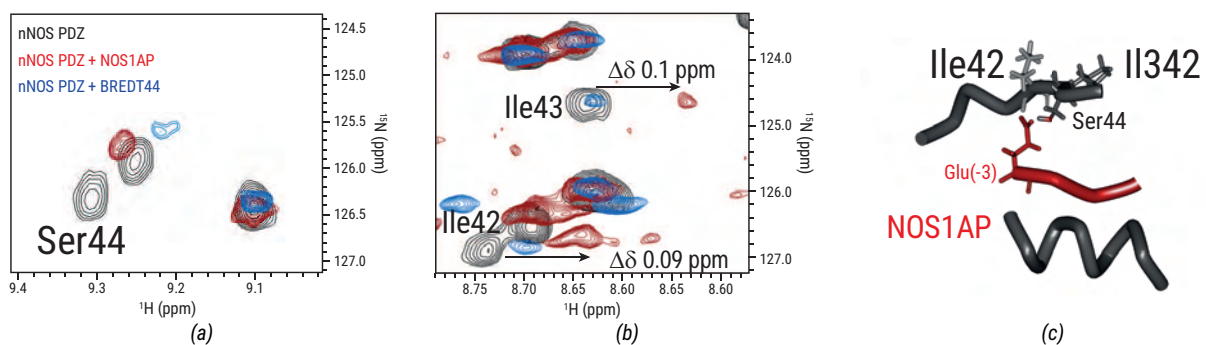
En la estructura tridimensional de ERBB2IP unido al péptido -WETWV\* (PDB ID: 1N7T) se aprecia cómo el residuo de  $\beta$ 3-5 (Arg1348) se combina con la Ser1325 en la posición  $\beta$ 2-2 para enlazar mediante sendas interacciones con la cadena lateral del ácido glutámico de la posición -3 del péptido ligado [253]. El aminoácido equivalente de DLG4, sin embargo, es una fenilalanina, y la función de contactar con el glutámico de la secuencia KKETPV recae en la posición anterior, una serina (Ser339)





**Figura 5.13:** Comparación de las secuencias del dominio PDZ de la nNOS con dominios PDZ que reconocen un residuo ácido en la posición -3. Se marcan con negrita los aminoácidos determinantes de este reconocimiento. La proteína ERBB2IP (*ErbB2 Interacting Protein*) reconoce el péptido -wETwV\* [253], DLG1 (*Disc Large homolog 1*) se asocia a la secuencia -RRETQV\*, DLG4 acoge el péptido -KKETPV\* y la sintrofina 1α (SNTA1) reconoce la secuencia de extremo C-terminal -GVKESLV\*.

en el sitio β3-4, y comparte la interacción con la Asn326 de la posición β2-2 [252]. De esta forma se establece el patrón de interacciones del ácido en posición -3, pudiendo formar un puente de hidrógeno con el aminoácido en β2-2, ocupado por serina o asparagina, un enlace salino con la lisina o la arginina β3-5 (como ocurre con ERBB2IP [253], DLG1 [254] o SNTA1 [255]), y alternativamente, un puente de hidrógeno con la serina o treonina en β3-4, como en DLG4 o SNTA1.



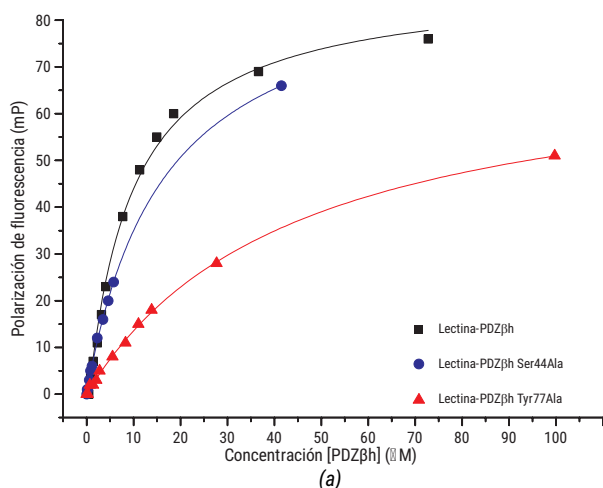
**Figura 5.14:** Alteraciones del espectro HSQC del dominio PDZ de la nNOS (nNOS 14-131) tras la adición de los péptidos NOS1AP (rojo) y Bredt44 (azul). (a) Desaparición de la señal de la serina 44 del dominio PDZ de la nNOS (negro en estado libre) tras la adición del péptido de NOS1AP. (b) Cambios de los desplazamientos químicos de los aminoácidos anteriores a Ser44, las isoleucinas 42 y 43 son más sensibles a la unión de NOS1AP, pero no se ven perturbadas por la interacción de Bredt44. (c) Representación tridimensional de la posición de las cadenas laterales de los aminoácidos Ile42, Ile43 y Ser44 por la inserción del ácido glutámico en la posición -3 del péptido de NOS1AP (-ELGDSLDD EIAV\*).

Nuevamente, uno de estos dos aminoácidos cae en la posición β2-2, que en la nNOS vuelve a ser la leucina 31. Sin embargo, el dominio PDZ de la nNOS sí que comparte el otro determinante en la hebra β3-4, la Ser44, la cual podría formar un puente de hidrógeno con el carboxilato de un residuo ácido en la posición -3 del péptido entrante. Dado que la interacción de un péptido enlazaría directamente con este residuo, se buscó esta específicamente interacción en los espectros de RMN del dominio PDZ en complejo con el péptido NOS1AP. En lugar de un cambio del desplazamiento químico, la señal espectroscópica correspondiente a la serina 44 del dominio PDZ muestra un ensanchamiento de la banda y desaparece del espectro (Fig. 5.14a), por lo que, aunque esto es un síntoma claro de una perturbación del ambiente químico de ese aminoácido, no permite realizar un seguimiento preciso. No obstante, los aminoácidos que preceden a esta posición sí que fueron muy sensibles a

la interacción del péptido. Como se puede ver en la figura 5.14b, la inserción del péptido NOS1AP, pero no la del péptido de Bredt (que no tiene un residuo ácido en -3), produce una perturbación en los desplazamientos químicos de los protones amídicos de las isoleucinas 42 y 43.

### 5.4.3. Los determinantes en el dominio PDZ de la nNOS

Habiéndose establecido los aminoácidos de la secuencia del dominio PDZ de la nNOS que permiten definir su selectividad hacia una amplia variedad de ligandos, se procedió mutar estos aminoácidos identificados para confirmar su importancia. Para ello, se sustituyeron la Ser44 y la Tyr77 por alanina, y se produjeron de forma recombinante siguiendo el mismo proceso que la forma salvaje, y se analizó la interacción del péptido Bredt123 por anisotropía de fluorescencia.



Proteína	$K_d$ ( $\mu$ M)	$P_{max}$ (UA)
PDZ $\beta$ h <sub>wt</sub>	8.83	88.7
PDZ $\beta$ h Ser44Ala	11.36	91.8
PDZ $\beta$ h Tyr77Ala	44.42	73.6

(b)

**Figura 5.15:** Unión del péptido Bredt123 (–DRLRNVRHGD<sup>AV\*</sup>) a los mutantes del PDZ $\beta$ h Ser44Ala (azul) y Tyr77Ala (rojo), comparados con la proteína silvestre (negro). El aminoácido Tyr77 une selectivamente el ácido -2 de la secuencia del péptido, por lo que su sustitución, aunque se sigue permitiendo la unión del péptido, desciende considerablemente su constante de disociación. La mutación Ser44Ala por el contrario hace que la afinidad por el péptido sea ligeramente menor, pero no supone una alteración considerable.

Ya se había establecido que este péptido contiene un residuo ácido en la posición -2, el cual es reconocido selectivamente por la tirosina 77 del dominio PDZ (Fig. 5.12), por lo que cabe esperar que la sustitución de este aminoácido evitaría, o al menos reduciría la capacidad de interacción de los péptidos de este tipo. Como se puede ver en la figura 5.15, la afinidad del dominio PDZ Tyr77Ala se ve reducida en comparación con la proteína nativa, mientras que la mutación de la serina 44, al ser el aminoácido determinante para la unión de péptidos con un residuo ácido en la posición -3 no afecta, o afecta poco a los que tienen el ácido en el sitio -2.

Experimentos posteriores con los otros péptidos marcados con una sonda fluorescente para un análisis de FP, o con los péptidos sin marcar por ITC permitirán en un futuro seguir definiendo el perfil peptídico de las interacciones del dominio PDZ de la nNOS.

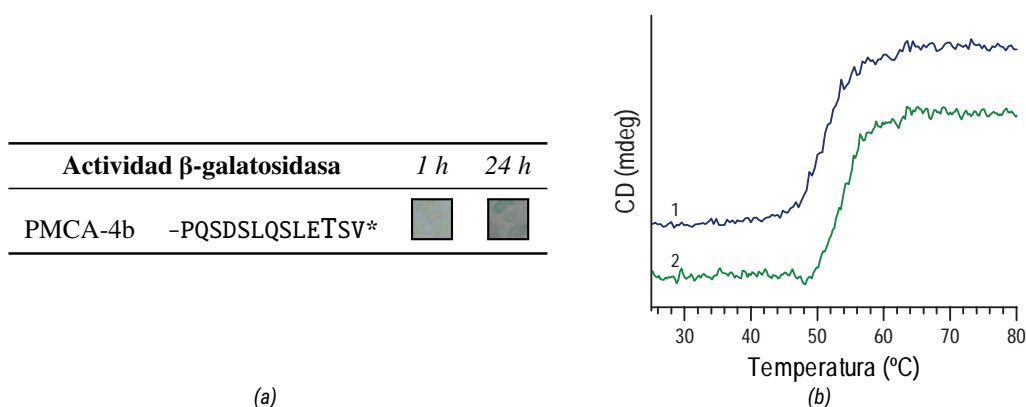


## 5.5. Análisis de la interacción de otras secuencias C-terminales

Durante el el trabajo desarrollado en esta Tesis se han puesto de manifiesto las preferencias del dominio PDZ de la nNOS por péptidos que tienen en la posición -2 un residuo ácido, a la vez que también pueden aceptar péptidos que tienen el residuo ácido en la posición -3. Sin embargo, están basados en una secuencia artificial, determinada por ensayos de afinidad. Para estudiar la relevancia real de estas secuencias en los ligandos celulares, se recopilieron las proteínas descritas en la literatura (ver la tabla 2.1), y se analizó su capacidad de interacción con el dominio PDZ de la nNOS mediante las técnicas utilizadas anteriormente. Entre ellas, algunas contienen el ácido en P(-2), y otras lo tienen en P(-3), y pueden pertenecer a cualquiera de los tipos tradicionales de clasificación.

### 5.5.1. Una secuencia de tipo I

Con los péptidos del trabajo de D. Bredt y con el extremo C-terminal de NOS1AP se ha caracterizado la interacción de PBMs de tipo III y de tipo II, respectivamente, pero la gran versatilidad que tiene el dominio PDZ de la nNOS permite la entrada además de péptidos de tipo I. Se ha podido caracterizar así la interacción de un péptido proveniente de la proteína ATPasa dependiente de calcio (*Plasma Membrane Calcium/calmodulin-dependent calcium ATPase*, PMCA-4b), un transportador de calcio dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, cuyo extremo C-terminal es un PBM de tipo I (-LPQSDSSLQSLQSV\*), y del que se ha descrito previamente su interacción con la nNOS [56]. Esta interacción podría ser relevante, pues, del mismo modo que el receptor de NMDA está asociado a la nNOS (aunque indirectamente), y el flujo de calcio tras su activación conduce su activación, con PMCA-4b puede estar pasando algo similar.

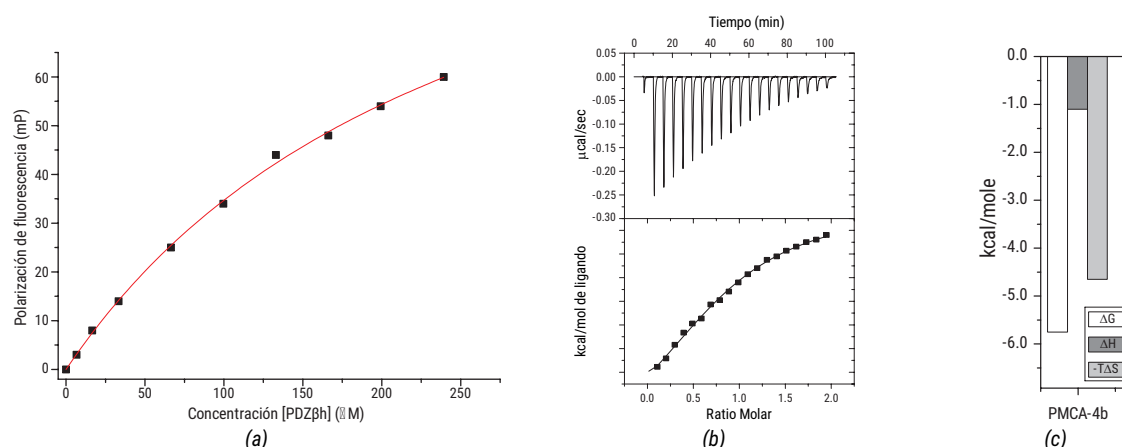


**Figura 5.16:** Interacción del dominio PDZ de la nNOS con PMCA-4b. (a) Interacción del extremo C-terminal de PMCA-4b ([pGBT9]EL-LPQSDSSLQSLQSV\*) estudiado por doble híbrido de levadura. Nótese que, aunque en tiempos cortos la interacción parece negativa, empieza a verse un cierto tono azul pasadas 24 h de incubación. (b) Desplazamiento de la  $T_m$  analizado por CD,  $\Delta T_m = 2 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ , comparando el dominio PDZ de la nNOS libre (1●) y un complejo entre éste y el péptido de PMCA-4b (2●).

Siguiendo la metodología habitual, se clonó el segmento C-terminal de PMCA-4b en los vectores de dobles híbridos de levadura, y se analizó su interacción por la producción de precipitado azul de la

$\beta$ -galactosidasa. Desafortunadamente no fue posible detectar una interacción positiva en el desarrollo normal de la técnica, aunque sí que apareció una cierta coloración azul a las 24h de incubación (Tabla 5.16a), proceso que no ocurre con los controles negativos. Por ello, se probaron otras técnicas para medir esta interacción, comenzando con el desplazamiento de la curva de la  $T_m$ .

Se incubó un péptido sintético con la secuencia C-terminal de PMCA-4b (-SSLQSLETSV\*) con el dominio PDZ de la nNOS producido recombinantemente, y se midió su  $T_m$  por CD. Se ve en la figura 5.16b un leve desplazamiento de la  $T_m$ , una variación de unos dos grados, que no es tanto como el detectado para los péptidos de Bredt o el de NOS1AP (Fig. 5.16b). Como se obtuvo esta interacción positiva, se analizó por anisotropía de fluorescencia para determinar su constante de afinidad, que ya con las técnicas anteriores se puede hacer una estimación de su magnitud. Mediante el uso del dominio PDZ recombinante y fusionado a la lectina (lectina-PDZ $\beta$ h), se añadieron cantidades crecientes de proteína sobre un péptido derivado del PMCA-4b y conjugado al FITC. La curva obtenida de polarización del FITC frente a la concentración de PDZ permitió ver que la afinidad de este péptido es extremadamente baja (Fig. 5.17a), menor aún que el péptido de NOS1AP. Por ello, para afinar aún más en la caracterización de esta interacción, se procedió a analizarla termodinámicamente por ITC.



**Figura 5.17:** Interacción del transportador de calcio PMCA-4b con el dominio PDZ de la nNOS. (a) Según la polarización del FITC conjugado al péptido -SSLQSLETSV\*, y el ajuste hiperbólico da una constante de disociación  $K_d \approx 260 \mu\text{M}$ . (b) Según la calorimetría (ITC), con el termograma en el panel superior y la isoterma de unión en el panel inferior. Se puede extraer una  $K_d \approx 59,9 \mu\text{M}$ . (c) Perfil termodinámico de la interacción del péptido de PMCA-4b con el dominio PDZ de la nNOS, donde se aprecia una asociación dirigida entrópicamente.

En la figura 5.17b se representa la titulación por ITC de la interacción del péptido de PMCA-4b con el dominio PDZ de la nNOS. El perfil termodinámico desvela una interacción entre el péptido de PMCA-4b y el dominio PDZ de la nNOS dirigida entrópicamente con poca aportación entálpica, además de verse una afinidad en torno a  $50 \mu\text{M}$ , bastante por debajo que las afinidades descritas anteriormente. Del mismo modo que ocurre en los experimentos con el péptido de NOS1AP, existe una discrepancia en la afinidad estimada por las técnicas fluorescencia y calorimetría. En ambos casos los péptidos utilizados en cada técnica son diferentes, uno de ellos con una molécula agregada en el extremo N-terminal, y es posible que esta característica adicional del péptido fluorescente pueda estar

afectando negativamente a la interacción. Aunque el extremo C-terminal se esté insertando en su sitio, es posible que la presencia del fluoróforo obstaculice la interacción accesoria del péptido en regiones más periféricas del dominio PDZ, y esto se traduzca en una asociación más debilitada.

Con todos estos experimentos se puede ver que la asociación de PMCA-4b con el dominio PDZ de la nNOS es real aunque de baja afinidad, aportando más evidencias a la promiscuidad que tiene este dominio y a los posibles mecanismos subyacentes a esta versatilidad.

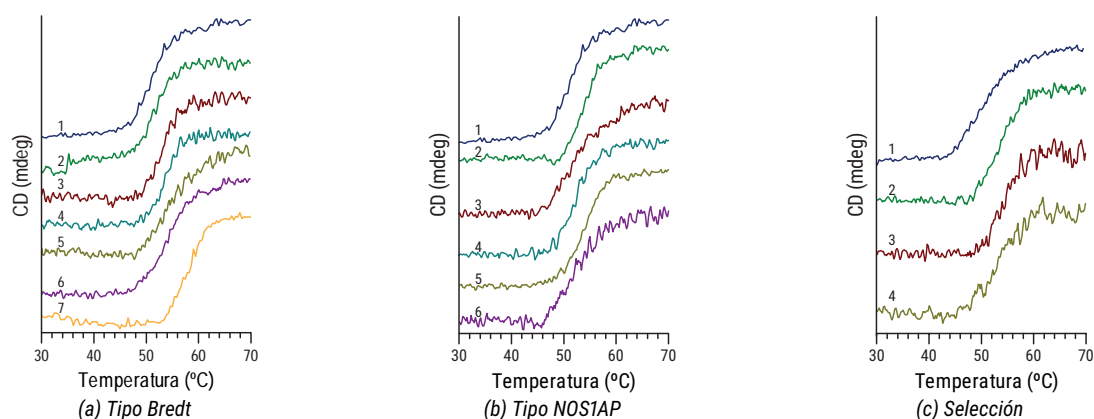
### 5.5.2. El resto de proteínas

Hasta ahora se han establecido las posibles bases moleculares del dominio PDZ de la nNOS, para los péptidos más representativos de los PBMs de las clases III y II, y se ha tocado superficialmente el motivo de tipo I presente en la bomba PMCA-4b. Para seguir definiendo el perfil de las interacciones del dominio PDZ de la nNOS se continuaron los experimentos con el resto de proteínas descritas, cuyas secuencias se recopilan en la tabla 2.1. Como se puede ver, estas secuencias son variadas, e incluye los tres tipos habituales de PBM, además de algunas que no encajan en ninguno de estos grupos. Cabe destacar que la mayor parte de las secuencias descritas pertenecen al grupo III, haciendo además que el dominio PDZ de la nNOS sea uno de los pocos que aceptan este tipo de extremos C-terminales.

También se clonaron estas secuencias C-terminales en el plásmido pGBT9 para estudiarlos en un ambiente celular, pero no ha sido posible detectar esas uniones con el ensayo del doble híbrido de levadura, probablemente debido a la baja afinidad que pueden tener, y por extensión la baja sensibilidad de la técnica para este tipo de interacciones. Se comenzó así con un barrido de los péptidos y su interacción con el dominio PDZ de la nNOS por dicroísmo circular. Se adquirieron una batería de péptidos sintéticos a partir de la información bibliográfica y se analizó su interacción al dominio PDZ de la nNOS recombinante por el desplazamiento de su  $T_m$ . Se puede ver en la figura 5.18 el efecto de la unión de los péptidos seleccionados. En general, la adición de todos los péptidos produce un desplazamiento de la  $T_m$  en diferentes grados (Tabla 5.5) siendo el péptido de Bredt44 el que mayor aumento de la  $T_m$  produce.

Como se puede comprobar en la tabla 5.5, la mayoría de los péptidos estudiados producen un aumento de la  $T_m$  en torno a +2 °C. Sin embargo, se han recopilado por separado en una figura (Fig. 5.18c) y una tabla (Tabla 5.5b) aquellos péptidos que han causado una  $\Delta T_m > 4$  °C, porque podría ser indicativo de una interacción posiblemente más fuerte. Éstos son el canal dependiente de voltaje Nav1.4 y las claudinas 3 y 14, las cuales fueron las únicas identificadas en un estudio a gran escala de interacciones a dominios PDZ [45]. En este mismo estudio, algunas de las otras proteínas de unión al dominio PDZ de la nNOS que también fueron analizadas dieron una interacción negativa, lo que sugiere que la interacción de las claudinas 3 y 14 o de Nav1.4 pueden ser de una afinidad mayor a las otras.

Para confirmar esta posibilidad, y teniendo la batería de péptidos sintéticos se analizaron por me-

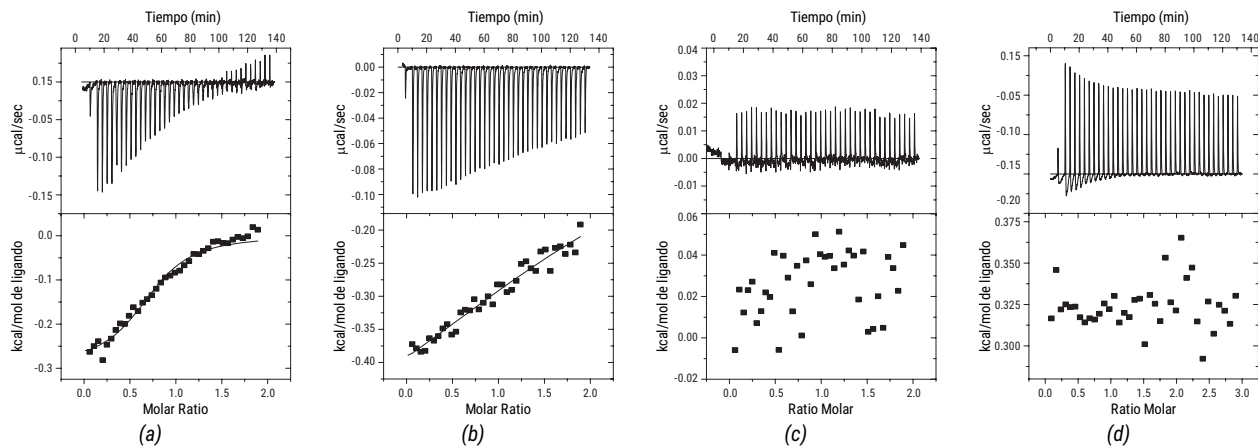


**Figura 5.18:** Interacción del dominio PDZ de la nNOS con péptidos derivados del extremo C-terminal de proteínas descritas en la literatura (ver tabla 2.1), seguidas por cambios en el patrón de desnaturalización térmica por CD tras la incubación de 20  $\mu$ M del dominio PDZ recombinante (nNOS 14-131) con 1 mM del péptido. (a) Interacción de los péptidos de tipo Bredt, con un residuo ácido en la posición -2. Se comparan las  $T_m$  del dominio PDZ de la nNOS en su estado libre (1●) y en asociación con los péptidos C-terminales de las proteínas NIDD (2●), CtBP (3●), el receptor  $\alpha$ -adrenérgico (4●), la citocromo c oxidasa (5●), y el receptor de melatonina (6●). Se compara a su vez con el péptido representativo Bredt44 (7●). (b) Interacción de los péptidos del tipo de NOS1AP, con el residuo ácido en posición -3, y otros tipos. El dominio PDZ de la nNOS, libre (1●) y unido a NOS1AP (2●) se compara con Vac14 (3●) y PFK-M (4●). Se incluyen las secuencias de tipo I (-S/T-X- $\Phi^*$ ) que tienen un ácido en la posición -3, y aquellos que no caen en un grupo claro, como el transportador de serotonina (5●) y el receptor 2B de serotonina (6●). (c) Se han separado los péptidos que dan la mayor diferencia en la  $T_m$ , además de Bredt44, y se comparan con el dominio PDZ libre (1●). Éstos son el canal dependiente de voltaje Nav1.4 (2●), y las proteínas de adhesión celular Claudina 3 (3●) y 14 (4●).

Tipo III		Tipo NOS1AP (y otros)	
Péptido	$\Delta T_m$ (°C)	Péptido	$\Delta T_m$ (°C)
● NIDD	$+1,8 \pm 0,5$	● NOS1AP	$+4,1 \pm 0,5$
● CtBP	$+2,6 \pm 0,1$	● Vac14	$+2,2 \pm 0,9$
● R. $\alpha$ -Adrenérgico	$+1,4 \pm 0,2$	● PFK-M	$+2,7 \pm 0,8$
● CytC	$+2,8 \pm 0,7$	● T. serotonina	$+3,1 \pm 0,5$
● R. Melat	$+2,6 \pm 0,8$	● R. 2B serotonina	$+1,5 \pm 0,2$
● Bredt44	$+7,7 \pm 1,5$	● Nav1.4	$+4,6 \pm 0,7$
● Claudina 3	$+4,2 \pm 0,2$		
● Claudina 14	$+5,0 \pm 0,1$		

**Tabla 5.5:** Variación de la  $T_m$  tras la adición de los péptidos que interaccionan con el dominio PDZ de la nNOS. Se han distribuido en cuatro conjuntos: (a) Péptidos de tipo III, similares en su secuencia a Bredt44 (un residuo ácido en -2); (b) Péptidos de tipo II similares a NOS1AP, con el residuo ácido en -3; (c) Péptidos de tipo I o de otras clases. El receptor 2B de serotonina tiene una Ser<sub>-2</sub>, pero una Val<sub>-3</sub>; y el transportador de serotonina, con la secuencia -GDIRM<sub>-3</sub>N<sub>-2</sub>AV\* no puede incluirse en ninguno de los conjuntos. (d) Péptidos en los que se ha detectado una variación de la  $T_m$  mayor que el resto.

dio la calorimetría de titulación, y así profundizar en el mecanismo de las interacciones. Se muestran a continuación las isotermas representativas (5.19), y los datos de todos los experimentos de ITC realizados están recopilados en la tabla 5.6. Solo se consiguieron curvas de las Claudinas 3 y 14 (Fig. 5.20, del canal Nav1.4 (Fig. 5.19a) y del receptor  $\alpha$ -adrenérgico, aunque de éste último, en las condiciones experimentales aquí utilizadas, no fue posible analizarla con precisión (Fig. 5.19b). Todas estas curvas revelan una interacción de baja afinidad en donde la entalpía global está muy reducida, y es la entropía la que dirige las interacciones.



**Figura 5.19:** Experimentos representativos de las interacciones con el dominio PDZ de la nNOS medidas por ITC. En el panel superior están los termogramas, y el de abajo las isothermas de unión de los péptidos del canal Nav1.4 (a), el receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico (b), y dos proteínas que también fueron analizadas pero que no se detectó una curva de asociación, la palmitoil transferasa NIDD/DHHC23 (c) y el receptor de melatonina (d). En todos los casos, una solución de los péptidos (1 mM) fue titulada sobre la lectina-PDZ $\beta$ h recombinante (unos 50  $\mu$ M).

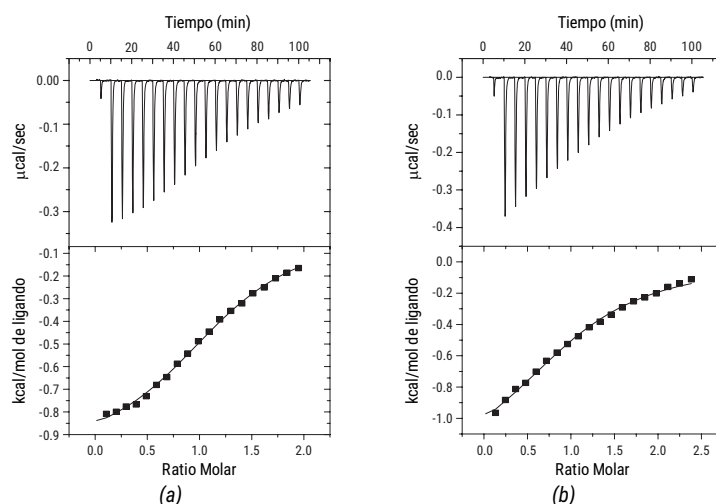
Se recopilan los datos termodinámicos de las interacciones del dominio PDZ de la nNOS con los péptidos en la tabla 5.6. Aunque todas estas proteínas están descritas en la literatura como ligandos del PDZ de la nNOS, en algunas de ellas sólo se ha conseguido detectar las interacciones por medio de los experimentos de dicroísmo circular, puesto que las condiciones experimentales utilizadas en cuanto a las concentraciones de péptido frente a las de PDZ, por muy baja que sea la constante de disociación, favorecen que el equilibrio esté desplazado hacia la formación del complejo.

Péptido	Secuencia	$K_a$ ( $M^{-1}$ )	$K_d$ ( $\mu$ M)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (cal/molK)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
<b>R. <math>\alpha</math>1-adrenérgico</b>	-LGENGEEV*	$6.05 \cdot 10^3$	165	-50161	-0.600	15.3	-4.561
<b>Claudina 3</b>	-GTAYDRKDYV*	$4.00 \cdot 10^4$	25.1	-6.264	-0.987	17.7	-5.227
<b>Claudina 14</b>	-HSGYRLNDYV*	$2.16 \cdot 10^4$	46.3	-5.909	-1.557	14.6	-4.352
<b>PMCA-4b</b>	-SSLQSLETSV*	$1.68 \cdot 10^4$	59.9	-5.754	-1.103	15.6	-4.651
<b>Nav1.4</b>	-RPGVKESLV*	$9.53 \cdot 10^4$	10.5	-6.792	-0.292	21.8	-6.499

**Tabla 5.6:** Recopilación de los datos termodinámicos obtenidos por ITC a partir de la titulación de los péptidos C-terminales de las proteínas sobre la lectina-PDZ $\beta$ h recombinante. Se analizaron numerosos péptidos, pero solo unos pocos de ellos dieron un termograma de unión. Están agrupados en los conjuntos descritos anteriormente, según su parecido a los péptidos de Bredt, de NOS1AP o sin determinar.

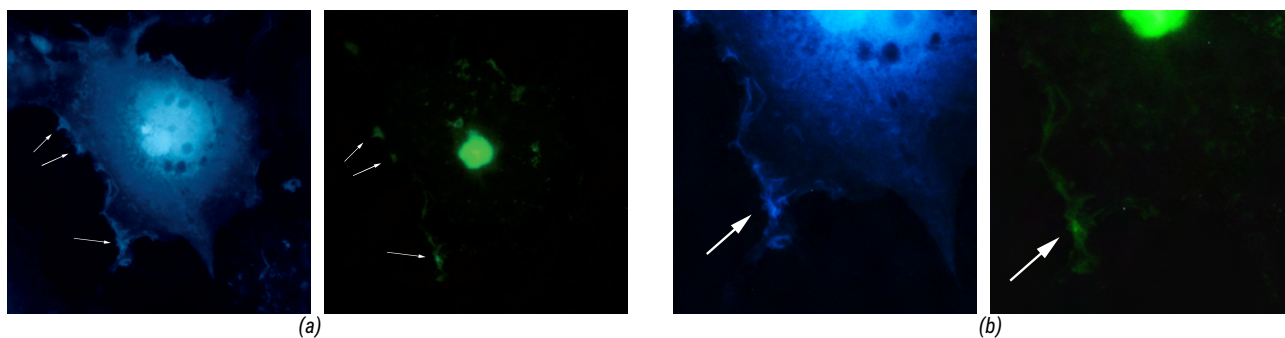
### 5.5.3. Las claudinas

Las claudinas son proteínas integrales de membrana que forman parte de las uniones estrechas como los principales componentes estructurales. Sus dos extremos están orientados hacia el citoplasma, traspasando la membrana plasmática cuatro veces, y a través de su interacción entre los dominios extracelulares de las claudinas de las células adyacentes son las responsables de sellar el espacio entre las membranas, y de mantener separados los compartimentos apical y basolateral de los epitelios.



**Figura 5.20:** Experimentos representativos de la asociación de los péptidos de las claudinas a la proteína recombinante lectina-PDZ $\beta$ h. En los paneles superiores están los termogramas, en los inferiores las isotermas de unión. La claudina 3 (a) y la claudina 14 (b) interaccionan con el dominio PDZ de la nNOS con afinidades 25 y 45  $\mu$ M, respectivamente (Tabla 5.6).

Las claudinas 3 y 14 fueron identificadas como posibles ligandos del dominio PDZ de la nNOS en un estudio a gran escala utilizando técnicas de fluorescencia [45]. En sus extremos C-terminales, tienen una secuencia acabada en -R/N-DYV\*, lo que las engloba en PBMs de tipo III, y se sitúan muy próximas a los péptidos de Brecht. A raíz de lo poco que se sabe de esta asociación, de que su secuencia es muy similar a los consensos establecidos para el dominio PDZ de la nNOS y su posible relevancia fisiológica en los procesos de regulación de las uniones celulares se decidió empezar a caracterizar por las técnicas biofísicas la unión de la nNOS a las claudinas. Primero se confirmó las interacciones con las claudinas descritas en el trabajo de Stiffler et al. [45] mediante CD (Fig. 5.18c), y a continuación se procedió a la caracterización termodinámica por calorimetría (Fig. 5.20).



**Figura 5.21:** Interacción intracelular entre la claudina y la nNOS. Células COS7 fueron transfectadas con las proteínas YFP-Claudina3 y CFP-nNOS(1-200), y fueron estudiadas en el microscopio de epifluorescencia. Se pueden identificar zonas de posible colocalización en las uniones estrechas (flecha).

Una vez analizadas las propiedades de la interacción del dominio PDZ de la nNOS con los péptidos derivados de las claudinas en experimentos *in vitro*, se estudió la interacción en células de mamífero mediante microscopía de fluorescencia, y ver así si las claudinas eran capaces de arrastrar a la nNOS a las uniones estrechas. Para ello, células COS7 y MDCK fueron transfectadas con dos cons-

trucciones fluorescentes, un fragmento de la nNOS (nNOS 1-200) en fase de la proteína fluorescente cian (*Cyan Fluorescent Protein*, CFP), y la claudina 3 completa con la proteína fluorescente amarilla (*Yellow Fluorescent Protein*, YFP). De forma preliminar se estudió la localización intracelular de ambas proteínas con el microscopio de epifluorescencia en células COS7.

Puede verse en la figura 5.21 que las claudinas se distribuyen principalmente en la membrana plasmática, en las zonas de contactos intercelulares (verde), presumiblemente en estructuras de tipo uniones estrechas, mientras que la nNOS (cian) tiene una localización principalmente citoplasmática con una cierta acumulación en el núcleo. Puede apreciarse además, que junto a la distribución citoplasmática del dominio PDZ de la nNOS hay un cierto posicionamiento de la proteína en las membranas coincidente con la claudina, lo que podría indicar que efectivamente las claudinas estarían reteniendo a la nNOS en estos compartimentos.

## Capítulo 6

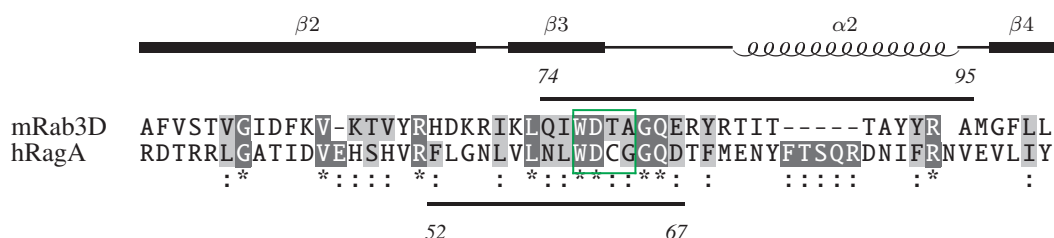
# La interacción de DYNLT1 con las GTPasas RagA y Rab3D

La interacción entre RagA y DYNLT1 se describió en el trabajo de Lukashok et al. [197], pero permaneció sin caracterizar y sin profundizar en su significado biológico, ya que el objetivo principal de este trabajo era la conexión entre estas proteínas y una proteína de adenovirus. Sirvió como punto de partida para iniciar los estudios de caracterización de los requerimientos de secuencia necesarios para DYNLT a raíz de otro estudio, unos 15 años más tarde, cuando fue descrita la interacción de una segunda GTPasa con DYNLT1. En este segundo trabajo, caracterizaron más en profundidad la interacción, y redujeron la región de interacción a una secuencia concreta de Rab3D, la cual era muy distinta a las secuencias de las otras proteínas que se fueron identificando que interaccionaban con DYNLT1. Esta secuencia, además de ser muy diferente a la de la cadena intermedia en el sitio de interacción de DYNLT1 (el ligando establecido como canónico) tampoco formaba parte de una región intrínsecamente desordenada (*Intrinsically Disordered Region*, IDR) en la proteína, en su lugar formaba una estructura perfectamente plegada e integrada en la estructura globular de la GTPasa. Para aclarar estas discrepancias se comenzó con el análisis de la interacción de DYNLT1 con las GTPasas RagA y Rab3D. Metodológicamente se iniciaron los estudios confirmando las interacciones entre DYNLT1 y RagA, menos caracterizada, para después profundizar a nivel celular y bioquímico.





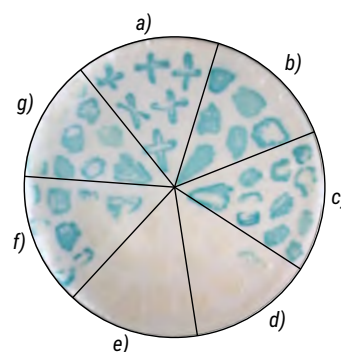
## 6.1. Identificación de la región de interacción entre RagA y DYNLT1



**Figura 6.1:** Región de las GTPasas Rab3D y RagA alrededor de la caja G (recuadro verde), donde se establece la interacción con DYNLT1. La barra superior indica el segmento 74-95 de Rab3D descrito por Pavlos [216], mientras que la barra inferior señala el segmento 52-67 de RagA, la región identificada en esa Tesis.

Los estudios realizados previamente con Rab3D delimitaron la zona de interacción de DYNLT1 sobre esta GTPasa a una región interna (Rab3D 74-95) cercana a la zona que sufre los cambios conformacionales dirigidos por la unión del nucleótido de GTP (*Switch II*) (Fig. 6.1 Pavlos et al. [216]). Por homología con Rab3D, se enfocan los estudios sobre RagA a la misma región. En ambas GTPasas, esta parte de la proteína se encuentra alrededor de la caja G, en una zona estructuralmente bien plegada, que comprende la hebra  $\beta 3$  y sobre todo la hélice  $\alpha 2$  (Fig. 6.1). Los conocimientos previos sobre las interacciones con DYNLL1 y DYNLT1 han establecido éstas se dan en regiones principalmente desordenadas de las proteínas, y que tras la asociación con las cadenas ligeras de las dineínas se induce la formación de una cadena  $\beta$  extendida. Este modelo hace difícil imaginar una interacción mediada por una hélice  $\alpha$ , y cabría esperar que la unión sea realmente mediante un segmento más N-terminal al delimitado.

##	Cebo (pGAD)	Presas (pAS404)	His	3AT	X-Gal
a)	DYNLT1	DYNLT1	++	++	++
b)	DYNLT1	RagAwt	++	++	++
c)	DYNLT1	RagA (L56A, V57G)	++	++	++
d)	DYNLT1	RagA (L58A, N59G)	++	—	—
e)	DYNLT1	RagA (W61A, D62G)	++	—	—
f)	DYNLT1	RagA (Q66A, D67G)	++	++	++
g)	DYNLT1	RagA (T68A, F69G)	++	++	++



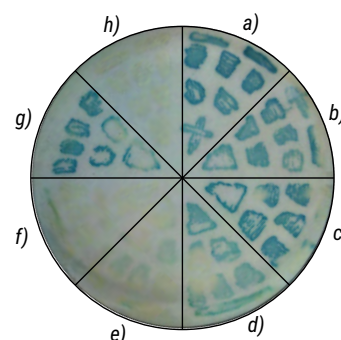
**Figura 6.2:** RagA interacciona con DYNLT1 en dobles híbridos de levaduras. La proteína RagA completa (b) interacciona con DYNLT1, y se pierde esta asociación al introducir las sustituciones en los alrededores de la caja G (d y e).

Con el fin de confirmar la hipótesis sobre la región de RagA que es reconocida por DYNLT1 y para iniciar los estudios sobre la interacción entre estas dos proteínas, se recurrió a la técnica del doble híbrido de levaduras, utilizando a la propia DYNLT1 como control positivo, dada su conocida capacidad de homodimerización. Como se muestra en la figura 6.2, DYNLT1 fue capaz de interaccionar

con RagA completa. Con el fin de identificar la región implicada en esta interacción, se procedió a realizar algunas mutaciones dobles (Ala-Gly) en la zona comprendida entre las posiciones 56 y 69, que corresponden en la estructura tridimensional a la hebra  $\beta 3$  y el lazo de conexión entre esta hebra y la hélice  $\alpha 2$ .

Se puede ver en la figura 6.2 que los residuos importantes de RagA, de cara a su interacción con DYNLT1, están reducidos a las posiciones 58 a 62. Las sustituciones de los aminoácidos Leu56 y Val57, Gln66 y Asp62, y Thr68 y Phe69 no tienen efecto sobre la interacción con DYNLT1, mientras que las sustituciones Leu58-Asn59 y Trp61-Asp62 la eliminan por completo.

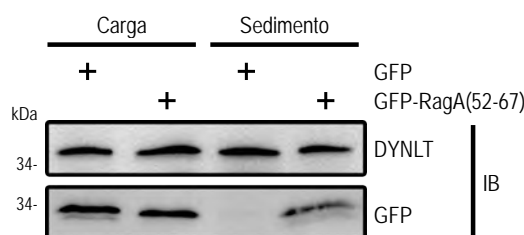
##	Cebo (pGAD)	Presa (pGBT9)	His	3AT	X-Gal
a)	DYNLT1	RagA(52-67)	++	++	++
b)	DYNLT1	RagA(52-67) L58G	++	++	+
c)	DYNLT1	RagA(52-67) N59G	++	++	++
d)	DYNLT1	RagA(52-67) L60G	++	++	+
e)	DYNLT1	RagA(52-67) W61G	++	–	↓
f)	DYNLT1	RagA(52-67) D62G	++	–	–
g)	DYNLT1	RagA(52-67) C63G	++	++	+
h)	DYNLT1	<i>unrelated</i>	++	–	–



**Figura 6.3:** Un fragmento de RagA interacciona con DYNLT1. Se han realizado mutantes individuales matizando los aminoácidos esenciales para la interacción, y se puede ver cómo la sustitución de Trp61 y Asp62 son determinantes.

Posteriormente, para acotar los estudios a una región más concreta se clonó el fragmento 52-67 de RagA, y se realizaron mutantes puntuales sobre estos residuos para determinar cuáles son los aminoácidos importantes para que ocurra la interacción con DYNLT1, sustituyendo las posiciones 58 a 63 por glicocola. En la figura 6.3 se puede ver que RagA(52-67) es suficiente para dirigir la asociación a DYNLT1. Las sustituciones Trp61Gly y Asp62Gly son las únicas que eliminan la interacción, mientras que las sustituciones Leu58, Asn59 y Cys63 por glicocola, aunque son capaces de complementar la síntesis de histidina y crecer en su ausencia, tienen una menor actividad  $\beta$ -galactosidasa, probablemente derivada de la distorsión del posible sitio de unión a DYNLT1. Las interacciones identificadas, tanto con RagA completa como con el fragmento RagA(52-67) es específica al no detectarse interacción entre DYNLT1 y una proteína no relacionada. Por lo tanto, se confirmó que la cadena  $\beta 3$  de la GTPasa es suficiente y necesaria para la interacción entre DYNLT1 y RagA. Se puede concluir de esta forma que la hélice  $\alpha 2$  no está implicada en esta interacción.

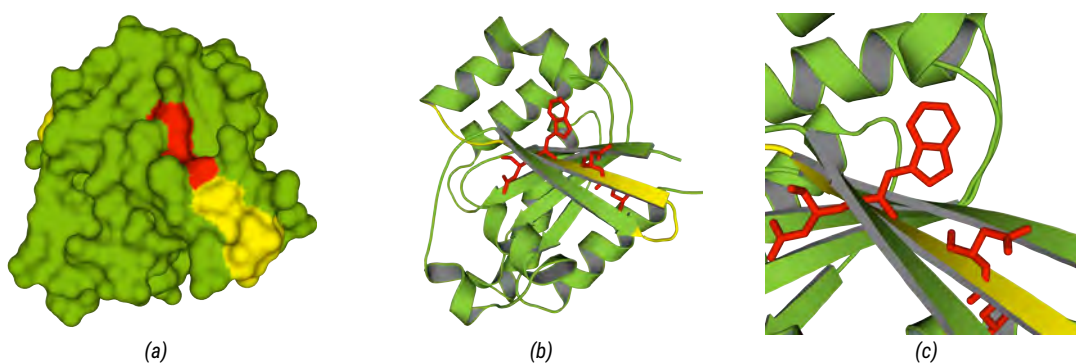
A continuación, se insertó el fragmento 52-67 de RagA en fase con la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*, GFP) como proteína de fusión en un plásmido para expresión celular, y se probó la interacción entre ambas proteínas por cosedimentación a partir de los extractos celulares transfectados. Se cotransfectaron células COS7 con los plásmidos pEGFP-DYNLT1 y pEGFP, tanto vacío como con RagA(52-67), y se sedimentó selectivamente a DYNLT1 (ver la sección 10.4 en Materiales y Métodos). Como se esperaba, DYNLT1 arrastró consigo al péptido de RagA, pero no a



**Figura 6.4:** Interacción de DYNLT1 y RagA. Células COS7 fueron cotransfectadas para sobre-expresar lectina-DYNLT1 y una de las dos, GFP o GFP fusionada al péptido de RagA(52-67). Lectin-DYNLT1 es secuestrada selectivamente y cosedimentada por su asociación a la Sefarosa 4B, y se revela el sedimento con anticuerpos específicos para DYNLT1 y GFP.

la GFP, indicando que la interacción entre DYNLT1 y RagA puede darse en un ambiente celular, y se puede acotar a la región predicha en la hebra  $\beta 3$ , alrededor de la caja G3 (Fig. 6.4), segmento que probablemente también corresponda con la zona de interacción de DYNLT1 en Rab3D.

Al analizar estos datos sobre las estructuras cristalográficas se puede ver que, tanto en Rab3D como en RagA, la hebra  $\beta 3$  está inmersa en la estructura globular, en lugar de en una IDR, como cabría esperar. La figura 6.5 es una representación de RagA de *H. sapiens* modelada sobre la estructura cristalográfica obtenida del ortólogo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, Gtr1p, y muestra cómo los aminoácidos correspondientes al segmento 52-67 (en amarillo) corresponden con la cadena  $\beta 3$ , que pertenece a una lámina formada en el interior de la GTPasa. En la hebra, los residuos se alternan a un lado y al otro, unos hacia el interior y otros hacia la superficie de la proteína. En particular, de los aminoácidos directamente implicados en la interacción con DYNLT, Asn59 y Trp61 están hacia la superficie, colocándose el triptófano con el plano aromático orientado de forma paralela a la dirección de la hebra.

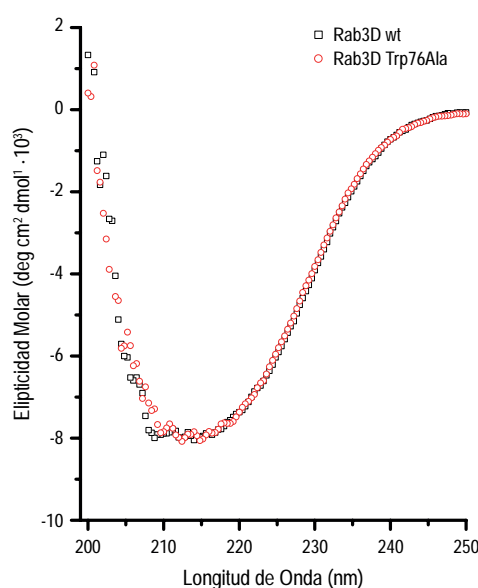


**Figura 6.5:** Representación de la estructura tridimensional de RagA humana, modelada sobre la estructura determinada por difracción de rayos X del ortólogo de levaduras Gtr1p (PDB ID: 4ARZ) con el programa Modeller. Se indica en amarillo la región acotada para la interacción de DYNLT1 (RagA 52-67), y en rojo los aminoácidos cuya sustitución modifica la unión de DYNLT1.

El plegamiento de RagA, como el de otras GTPasas, hace que los residuos del segmento identificado en estos experimentos para dirigir la interacción con DYNLT1 estén localizados en una región globular, con una conformación en la que sólo está expuesta una pequeña superficie. Esta situación dificulta la interpretación de los resultados presentados, porque, como cabría esperar, no existe una

región extendida que pueda colocarse en el surco hidrofóbico de DYNLT1, lo que hace difícil imaginar cómo una cadena  $\beta$  ya formada puede ser extraída de la estructura globular para quedar disponible para la interacción.

Además, estos residuos forman parte de la característica caja G3 ( $\Phi\xi\Phi\Phi DxxG\xi$ ) [256], donde  $\xi$  indica un aminoácido hidrofílico, mientras que  $\Phi$  hace referencia a un aminoácido hidrofóbico [257]), especialmente el Asp62, que permanece invariable en todas las GTPasas, y está implicado en la unión del ión  $Mg^{2+}$ , necesario para la asociación del nucleótido, por lo que una interacción con DYNLT1 de la forma canónica implicaría necesariamente la desestructuración de una región fundamental para la actividad GTPasa, y por tanto, la pérdida de su función.

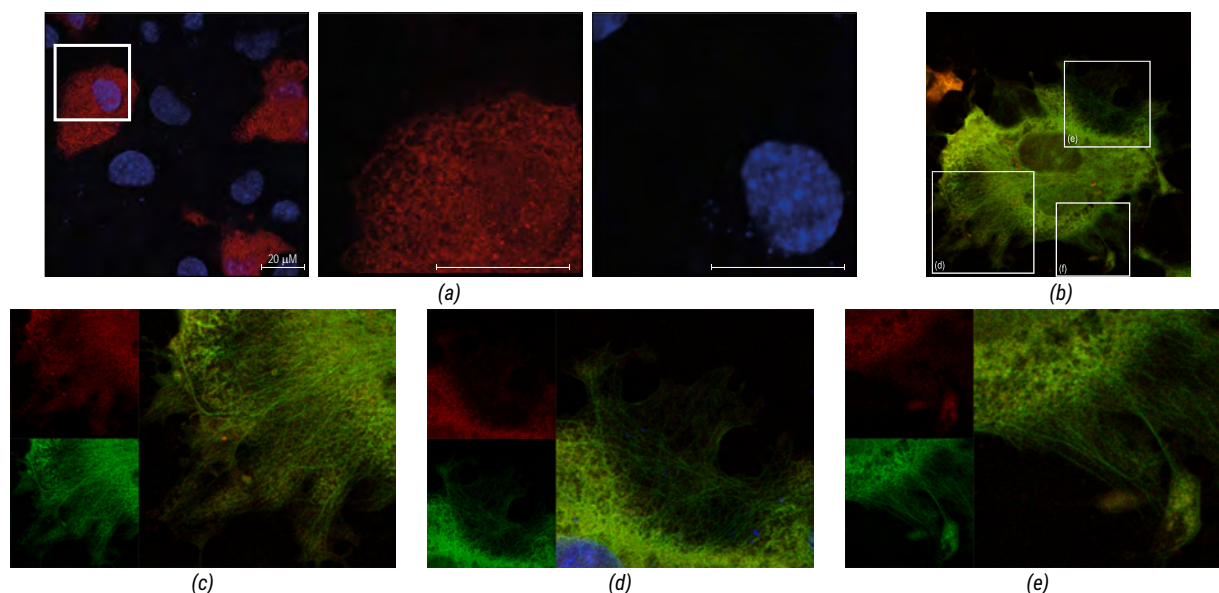


**Figura 6.6:** Espectros de dicroísmo circular de Rab3D. Comparación de los espectros de Rab3D silvestre con el mutante Trp76Ala

Dada su posición interna en la estructura de las GTPasas, la distorsión de esta región por la sustitución de los aminoácidos podría producir la pérdida de la conformación globular nativa, pudiendo ser ésta la causa de la pérdida de la interacción al introducir las mutaciones. Para descartar esta posibilidad, se clonaron y expresaron de manera recombinante las proteínas mutantes, tomando como modelo la GTPasa Rab3D ante la imposibilidad de obtener RagA recombinante porque se acumulaba en cuerpos de inclusión en las bacterias. Se realizaron espectros de dicroísmo circular de Rab3D, tanto de la proteína salvaje como del mutante Trp76Ala, en la posición equivalente al Trp61 de RagA. La figura 6.6 muestra cómo el mutante Trp76Ala de Rab3D, tiene un espectro de dicroísmo circular perfectamente superpuesto al de la versión nativa, indicando que la sustitución de esta posición, al menos por un residuo alifático, no produce ningún efecto detectable en la conformación de la proteína.

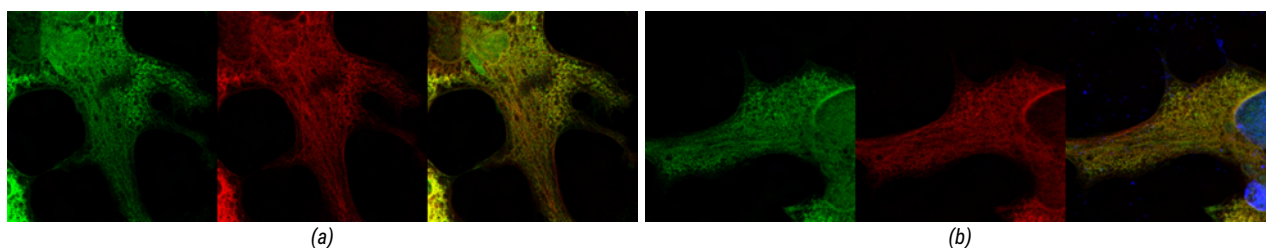
## 6.2. Caracterización de la interacción *in vivo*

Para confirmar la interacción entre RagA y DYNLT1 en un ambiente celular y estudiar sus efectos sobre la localización intracelular de ambas proteínas, se realizaron una serie de transfecciones para su análisis por microscopía confocal.



**Figura 6.7:** Localización intracelular de DYNLT1, vista al microscopio confocal (a) mCherry-DYNLT1 tiene una localización dispersa, punteada por el citoplasma (b) La coexpresión de DYNLT1 con GFP- $\alpha$ tubulina muestra que, aunque se ve cierta colocalización de DYNLT sobre los microtúbulos, la mayor parte de la cadena ligera no está asociada a la estructura microtubular. Los recuadros señalan las ampliaciones (d), (e) y (f).

Se ha determinado anteriormente que DYNLT1 está presente en dos poblaciones subcelulares, una asociada a los microtúbulos y otra que no [113]. Primero se confirmó la distribución de DYNLT1 sobre-expresada. La figura 6.7a muestra cómo la expresión transitoria de mCherry-DYNLT1 en células COS7 tiene una distribución dispersa por el citosol, punteada y en estructuras filamentosas. También localiza en el núcleo celular, acumulándose además en una región perinuclear, próxima al aparato de Golgi, muy probablemente correspondiente al centro organizador de microtúbulos (*Microtubule Organizing Center*, MTOC), de donde surge la red de microtúbulos de la célula (Fig. 6.7).



**Figura 6.8:** Distribución intracelular de RagA. Células COS7 fueron cotransfectadas con los plásmidos pEGFP-RagA y mCherry- $\alpha$ Tubulina, y analizadas en el microscopio confocal. Puede verse cómo GFP-RagA tiene una cierta colocalización con los microtúbulos, posiblemente causada por su interacción con DYNLT1.

A continuación se estudió la localización intracelular de RagA. Para ello se cotransfectó RagA completa fusionada a GFP, con  $\alpha$ -tubulina fusionada a mCherry. Se ha descrito que el ortólogo de RagA en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, Gtr1/2 tiene una distribución fundamentalmente citoplasmática, aunque también puede aparecer en los núcleos[258]. En la figura 6.8 se puede ver cómo RagA fusionada a la GFP tiene una distribución por la toda la célula incluyendo los núcleos, mostrando una asociación parcial con los microtúbulos. La localización microtubular de RagA bien podría estar causada por su asociación a DYNLT1, y para confirmarlo se coexpresaron las proteínas DYNLT1 y RagA fusionadas a mCherry y GFP, respectivamente (Fig. 6.9), a la vez que la colocalización de GFP-RagA con DYNLT1 endógena pudo analizarse utilizando un anticuerpo monoclonal específico.

Nuevamente, RagA aparece tanto en el núcleo como en estructuras discretas del citoplasma y puede verse el alto grado de colocalización entre ambas proteínas en la figura 6.9a. La colocalización parcial con los microtúbulos también fue confirmada con la coexpresión de RagA y la cadena intermedia (*Dynein Intermediate Chain*, DIC), etiquetadas con GFP y mCherry respectivamente (Fig. 6.9b). La colocalización de GFP-RagA con la DIC endógena fue detectada con un anticuerpo policlonal específico (Fig. 6.9c).

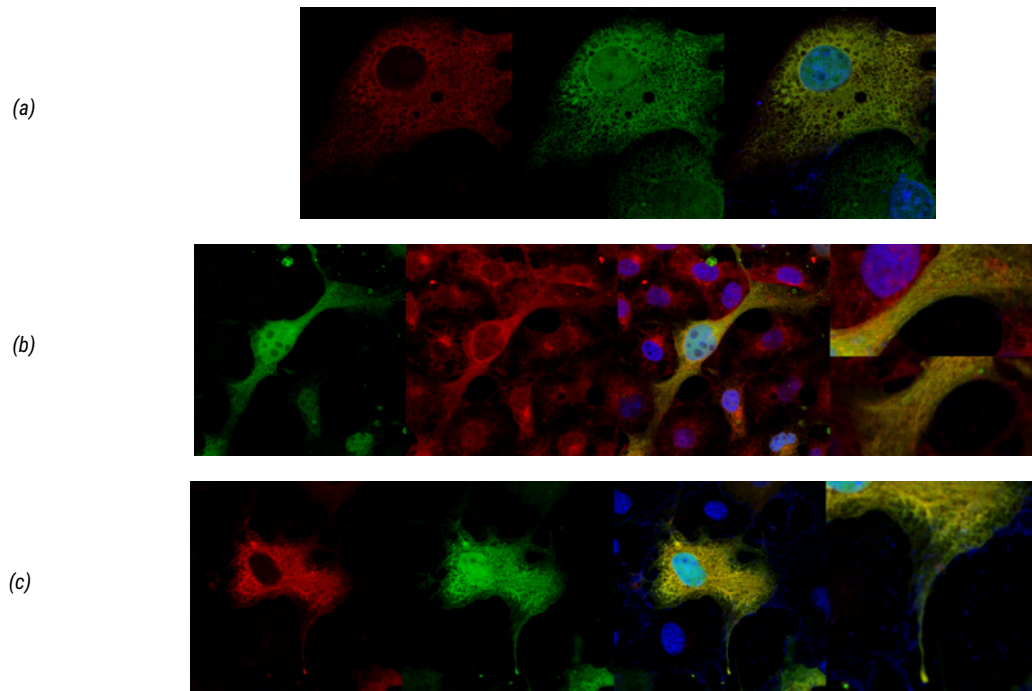
Seguidamente, para demostrar que la región mínima de interacción de RagA también es funcional en un ambiente celular, se fusionó el segmento 52-67 de RagA a la GFP, y se sobre-expresó en células COS7. En este caso, la proteína de fusión GFP-RagA(52-67) es predominantemente nuclear, y es capaz de arrastrar a DYNLT1 al núcleo.

Finalmente, tal y como se determinó anteriormente en los experimentos de doble híbrido de levaduras, la mutación doble de RagA (Trp61Gly-Asp62Ala) es incapaz de unirse a DYNLT1 en un ambiente celular. Por ello se sobre-expresó esta construcción mutante fusionada a la GFP junto a mCherry-DYNLT1, y se vio una ausencia casi total de colocalización. RagA(Trp61Gly, Asp62Ala) aparece como vesículas densas de distribución perinuclear, que no muestra colocalización con DYNLT1 (Fig. 6.11). Se descartó la posibilidad de que sean agregados de proteína desnaturalizada con los experimentos de dicróismo circular descritos anteriormente (Fig. 6.6).

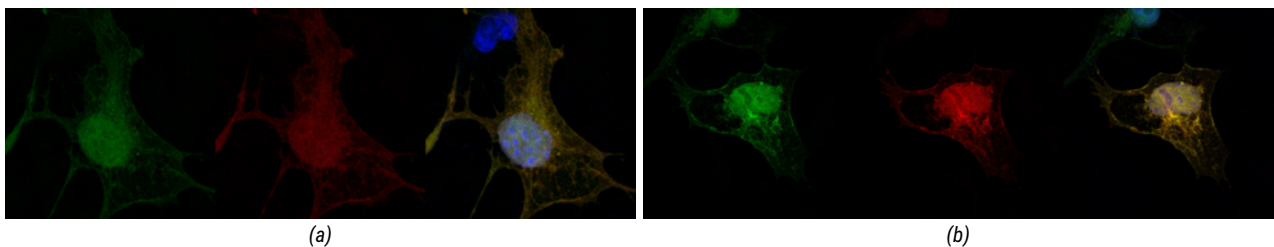
La región definida en estos experimentos comprende la caja G3 de las GTPasas, que está implicada en la unión del trifosfato de guanosina (GTP), próxima a la región *Switch II*, por lo que cabe la posibilidad de que la interacción a través de esta zona sea dependiente de la ocupación del nucleótido en la GTPasa. Para explorar esta posibilidad, se realizó un experimento de cosedimentación en diferentes condiciones que afectan a la unión del GTP. En las proteínas que unen nucleótidos, el nucleótido necesita un ión de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) para favorecer la interacción de los grupos fosfato, altamente negativos, con el sitio activo. La quelación del  $Mg^{2+}$  con ácido etilén diamino tetraacético (EDTA), evitaría la unión del nucleótido manteniendo el sitio vacío y a la enzima en conformación inactiva. Por otro lado, se hizo uso del 5'-guanilil imidodifosfato (GPPNP), un análogo del GTP, en el que se ha sustituido el oxígeno del enlace fosfoéster del fosfato y por un enlace fosfoimido, no hidrolizable. En presencia este compuesto, RagA se mantiene en la conformación activa.

Las células COS7 fueron cotransfectadas con lectina-DYNLT1 y las GTPasas RagA o Rab3D. Se

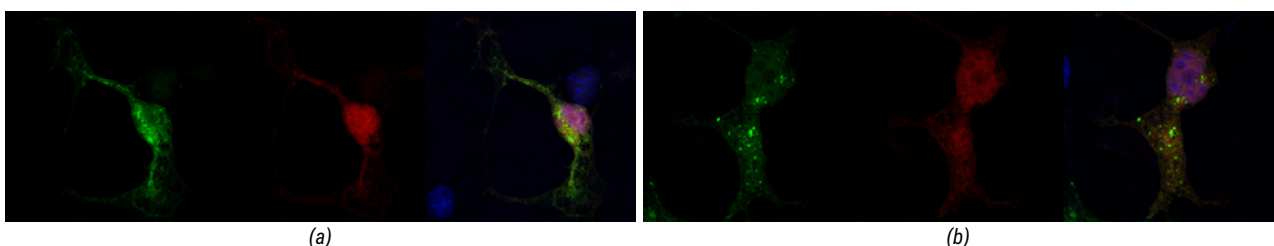




**Figura 6.9:** Estudio de la colocalización de DYNLT1 y RagA por microscopía confocal. (a) Células COS7 fueron cotransfectadas para expresar mCherry-DYNLT1 y GFP-RagA. La cotransfección de GFP-RagA y mCherry-DIC también muestra una cierta colocalización (b), del mismo modo que la sobre-expresión de RagA con la DIC endógena, detectada con un anticuerpo policlonal (d).

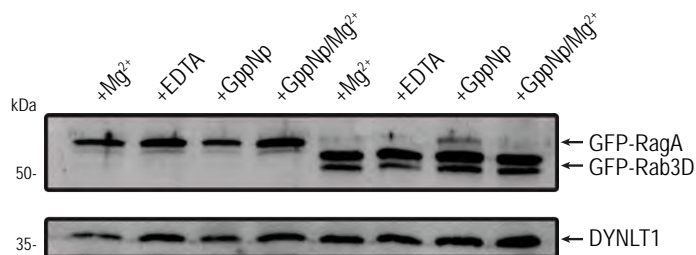


**Figura 6.10:** Colocalización del fragmento 52-67 de RagA1 (verde) y DYNLT1 (rojo) estudiada por microscopía confocal. Células COS7 fueron co-transfectadas con GFP-RagA(52-67) y con mCherry-DYNLT1. Hay un alto grado de colocalización, como se puede ver en la imagen superpuesta.



**Figura 6.11:** Estudio de la interacción de los mutantes RagA (Trp61Gly-Asp62Ala). Las células COS7 fueron cotransfectadas con mCherry-DYNLT1 y el doble mutante de GFP-RagA completa (Trp61Gly-Asp62-Ala) y analizadas por microscopía confocal. El mutante de RagA se acumula en cuerpos vesiculares aunque su plegamiento sea nativo, y se aprecia una ausencia total de colocalización.





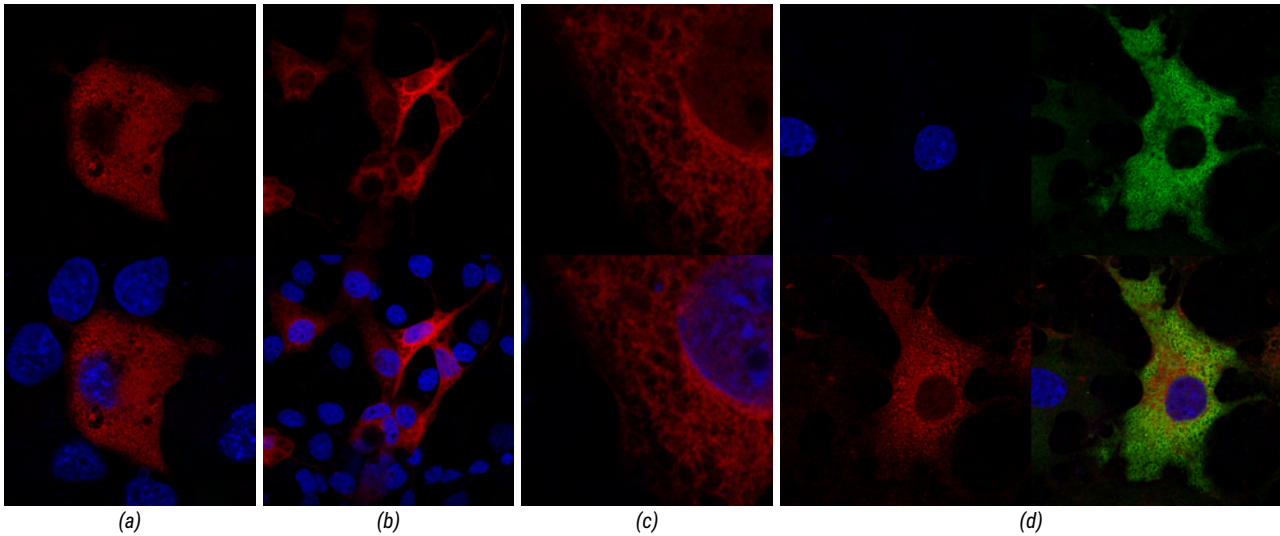
**Figura 6.12:** Dependencia del nucleótido GTP en la interacción con DYNLT1 en un experimento de cosedimentación. Células COS7 se cotransfectaron con las GTPasas RagA y Rab3D fusionadas a GFP, y con la construcción lectina-DYNLT1. Se incubaron los extractos celulares con las condiciones indicadas, y se sedimentó selectivamente la lectina con Sefarosa 4B. Las diferentes condiciones probadas no muestran un comportamiento diferencial en cuanto a la asociación de las GTPasas a DYNLT1.

incubaron los extractos celulares con cada una de las condiciones siguientes: EDTA,  $Mg^{2+}$ , GPPNP, y GPPNP en presencia de  $Mg^{2+}$ , y se sedimentó selectivamente a DYNLT1. Como se puede ver en la figura 6.12, los experimentos de cosedimentación muestran que tanto RagA como Rab3D se asocian a la DYNLT1 en todas las condiciones analizadas, apoyando los resultados previos de que el segmento corto alrededor de la caja G3 es suficiente para dirigir esta interacción.

### 6.3. Asociación simultánea de DYNLT1, RagA y DIC

Se desconoce cuál es la función exacta de la interacción de DYNLT1 con RagA. Como DYNLT es una proteína integral del motor de la dineína, la asociación a diversos ligandos podría servir para su transporte por los microtúbulos o una forma de secuestrar a las proteínas para regular su localización y actividad. La primera hipótesis es válida sólo si, a través de DIC, DYNLT1 es capaz de interaccionar simultáneamente con la dineína y con la proteína en cuestión. Las pocas estructuras disponibles de DYNLT1 muestran cómo el homodímero se asocia a la DIC mediante la inserción de una región extendida en un surco hidrofóbico, extendiendo la lámina  $\beta$  antiparalela ya existente, una asociación simétrica para favorecer la dimerización de la DIC, pero que restringe las posibilidades de interacción simultánea con otras proteínas a la superficie de DYNLT, o a una nueva superficie creada con la inserción de DIC.

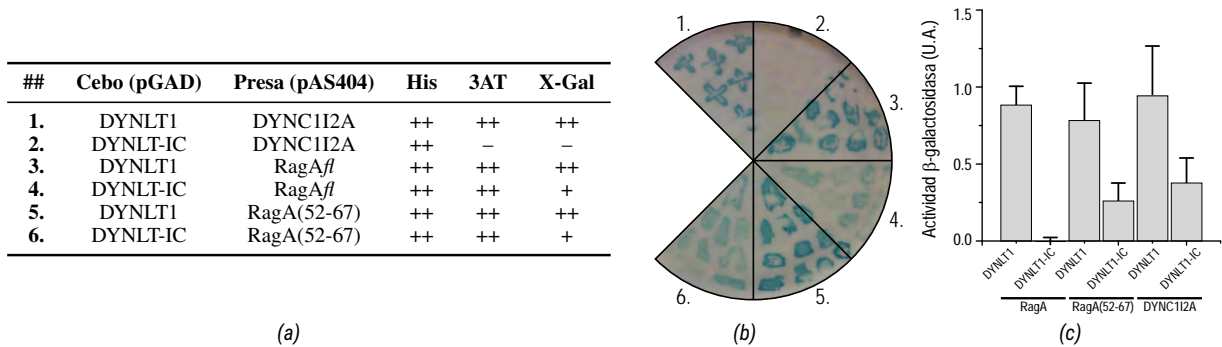
Para explorar las posibilidades de un segundo sitio de unión en DYNLT1, se crearon construcciones en las que se fusionó la región de interacción de DYNLT1 de la cadena intermedia en el extremo C-terminal de DYNLT1, aprovechando la cercanía espacial entre este extremo y el N-terminal de la DIC en el surco del dímero (ver la Fig. 10.1 en la sección 10.1.4 de los Materiales y Métodos), quimera que se denominó DYNLT-IC. Lo primero que llama la atención de esta construcción es su localización subcelular en células de mamífero (Fig. 6.13). Al igual que DYNLT1 silvestre, DYNLT-IC también tiene una distribución dispersa por el citoplasma, pero está completamente excluida del núcleo y no se aprecia asociación a los microtúbulos. Esto además podría indicar la interacción de



**Figura 6.13:** Localización intracelular de la construcción quimérica DYNLT-IC analizada por microscopía confocal. (a), (b), (c) mCherry-DYNLT-IC fue transfectada en células COS7, y puede verse que, a diferencia de DYNLT1, no entra en el núcleo. (d) Células COS7 fueron cotransfectadas con mCherry-DYNLT-IC y FLAG-DIC. La cadena intermedia fue marcada con un anticuerpo contra el epítipo FLAG y detectada con un anticuerpo secundario conjugado con FITC. No se aprecia colocalización, como puede verse en la imagen superpuesta.

DYNLT1 con una proteína nuclear, aún sin identificar, que ocuparía el mismo sitio de unión que la propia DIC, y favorecería su translocación al núcleo, pero que no se da cuando éste está ocupado.

A continuación, se estudió la interacción entre RagA y esta construcción quimérica en doble híbrido de levadura, y se comprobó que mientras DIC es incapaz de asociarse a DYNLT-IC, por tener su sitio ocupado, las construcciones de RagA, tanto la proteína completa como el fragmento mínimo RagA(52-67) son capaces de unirse a la forma autosaturada de DYNLT1, aunque con una interacción más débil, que se pone de manifiesto en una menor actividad  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 6.14).

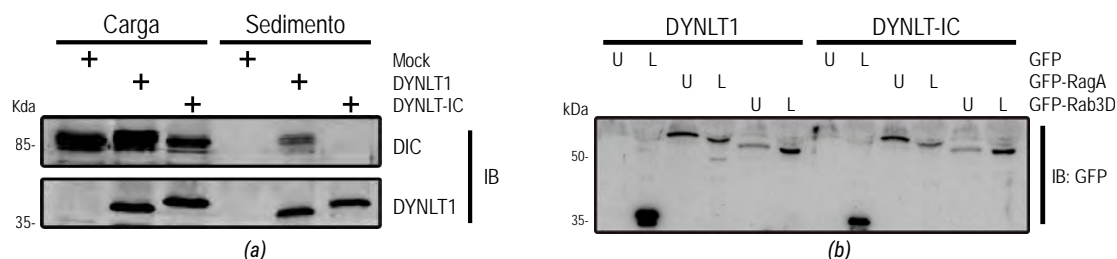


**Figura 6.14:** RagA interacciona con DYNLT-IC. (a) Recopilación de las interacciones entre DYNLT1-IC y las diferentes construcciones de RagA, comparadas con la DIC. (b) Ensayo de la  $\beta$ -galactosidasa y (c), cuantificación de la actividad  $\beta$ galactosidasa. El fragmento de DIC fusionado a DYNLT1 ocupa el surco de unión y evita la inserción de una nueva cadena intermedia, pero permite la interacción de RagA, probablemente en un segundo sitio superficial.

Como era de esperar, el sitio canónico de unión de la DIC queda ocupado por la fusión artificial, impidiendo la entrada de una nueva cadena intermedia. Se confirma también que la interacción de la GTPasa RagA se da incluso cuando este sitio está ocupado, indicando que la interacción ocurre por

un mecanismo diferente a la unión de la DIC, y se valida en el ensayo de dobles híbridos de levaduras el modelo de DYNLT-IC para estudiar esta segunda superficie de unión.

Se aplicó modelo de aproximación a experimentos de cosedimentación en células de mamífero para confirmar ésta interacción en un ambiente celular. Se cotransfectaron células COS7 con DYNLT1 y lectina-DYNLT1 junto a FLAG-DIC. La sedimentación selectiva de DYNLT con Sefarosa 4B, y la inmunodetección de la cadena intermedia a través de su epítipo fusionado FLAG muestra que, mientras que DYNLT1 es capaz de sedimentar a DIC, no lo hace la forma autosaturada, validando una vez más este modelo en células (Fig 6.15a).

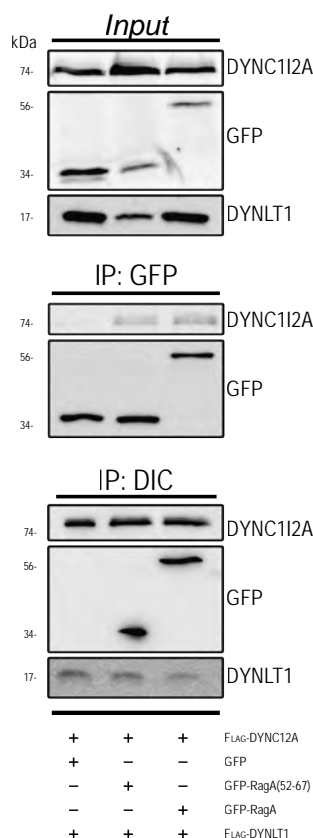


**Figura 6.15:** Interacción de las GTPasas a DYNLT1 y DYNLT-IC en células de mamífero. Células COS7 fueron cotransfectadas con la forma silvestre y autosaturada de DYNLT, fusionada al tag de lectina, en combinación con las GTPasas RagA o Rab3D fusionadas a GFP. Se muestra la fracción sedimentada (U, unido) y la fracción soluble (L, libre).

A continuación, se utilizó este modelo para determinar en células la asociación de las GTPasas a DYNLT, tanto a la forma silvestre como a la forma autosaturada. Extractos de células COS7 coexpresando lectina-DYNLT1 o DYNLT-IC, junto a las GTPasas RagA o Rab3D fusionadas a GFP fueron incubados con Sefarosa 4B para sedimentar selectivamente la lectina y se detectaron las GTPasas con anticuerpos específicos contra la GFP. Como se puede ver en la figura 6.15b, ambas GTPasas son capaces de unirse a DYNLT1 y a DYNLT-IC, detectándose una parte considerable de la proteína en la fracción sedimentada (U), mientras que la GFP fue incapaz de asociarse a ambas proteínas (DYNLT1 o DYNLT-IC), dado que toda la GFP se detecta en la fracción soluble (L).

Se puede confirmar así que ambas GTPasas son capaces de unirse a DYNLT1, tanto en su forma *apo* como teniendo el surco de la interfase ocupado, indicando que se asocia en una superficie distinta a la cadena intermedia, y se permitiría de esta forma que ambas proteínas, la GTPasa y la DIC, estén asociadas simultáneamente a DYNLT1, y explicaría del mismo modo el mecanismo por el que las GTPasas pueden estar asociadas a los microtúbulos, una situación que sólo tiene un precedente en la proteína Lfc, una GEF de Rho [214]. Para demostrar la formación de un complejo ternario, se realizaron experimentos de cosedimentación en el que las células de mamíferos fueron transfectadas con las construcciones GFP-RagA y GFP-RagA(52-67), con la cadena intermedia etiquetada con el péptido FLAG (FLAG-DIC).

Si se forma un complejo ternario, con DYNLT1 conectando RagA a DIC, al inmunoprecipitar con GFP, seríamos capaces de detectar a la cadena intermedia y viceversa. Se puede ver en la figura 6.16 que la inmunoprecipitación específica de la GFP permitió la detección de las tres construcciones (GFP, GFP-RagA completa y GFP-RagA(52-67)) en la resina sedimentada. A su vez, se pudo detectar



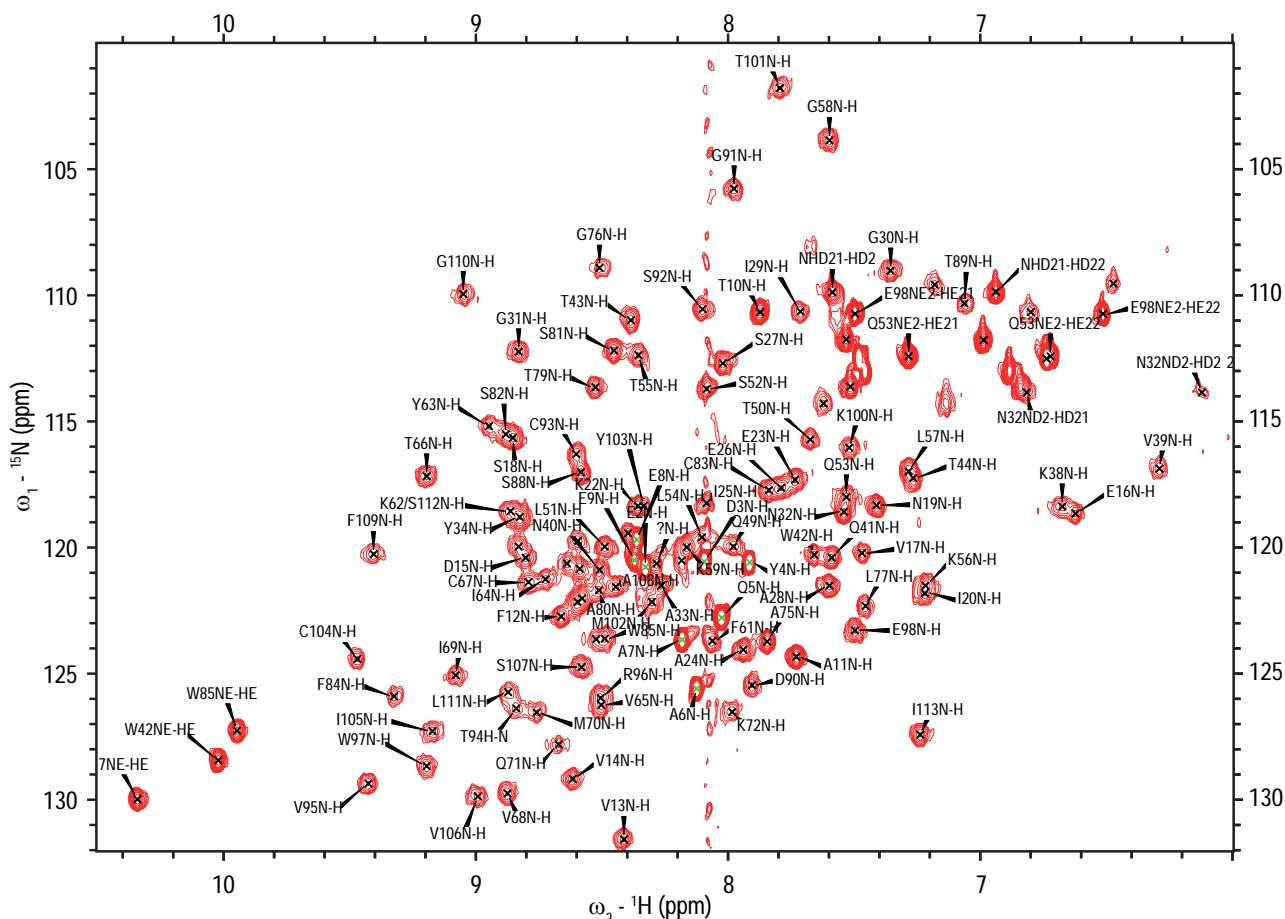
**Figura 6.16:** Formación del complejo ternario entre DIC, DYNLT1 y RagA en un ambiente celular. Células COS7 fueron co-transfectadas para expresar las tres proteínas (FLAG-DIC, *Flag*-DYNLT1 y una de las dos construcciones de RagA, GFP-RagA completa o GFP-RagA(52-67). Las células fueron entonces lisadas y se inmunoprecipitó selectivamente la proteína indicada en cada caso con anticuerpos específicos

a la DIC sólo en el sedimento de GFP-RagA completa y GFP-RagA(52-67), pero no en el de GFP, indicando que la cadena intermedia ha sido secuestrada selectivamente por RagA y su región mínima, presumiblemente mediante su interacción con DYNLT1.

La inmunoprecipitación inversa, esto es, sedimentar específicamente a DIC, permitió detectar a RagA y RagA(52-67), pero no GFP, en los inmunocomplejos (Fig. 6.16). En conjunto, estos resultados muestran claramente que, en efecto, RagA y DIC forman parte de un mismo complejo en mamíferos, probablemente gracias a la conexión mediada por DYNLT1, la cual fue fácilmente detectada en los inmunocomplejos de DIC. Sin embargo fue más difícil de detectar cuando se inmunoprecipitó la GTPasa a través de su epítipo GFP.

## 6.4. Caracterización estructural de la interacción

La demostración de que el péptido derivado de RagA(52-67) es la región clave para la interacción con DYNLT1 permitió dirigir un análisis estructural más específico. Utilizando péptidos sintéticos de la cadena intermedia, Rab3D y RagA, cuya secuencia comprende la región identificada, se realizaron una serie de estudios estructurales por RMN para tratar de definir qué aminoácidos de DYNLT1 se

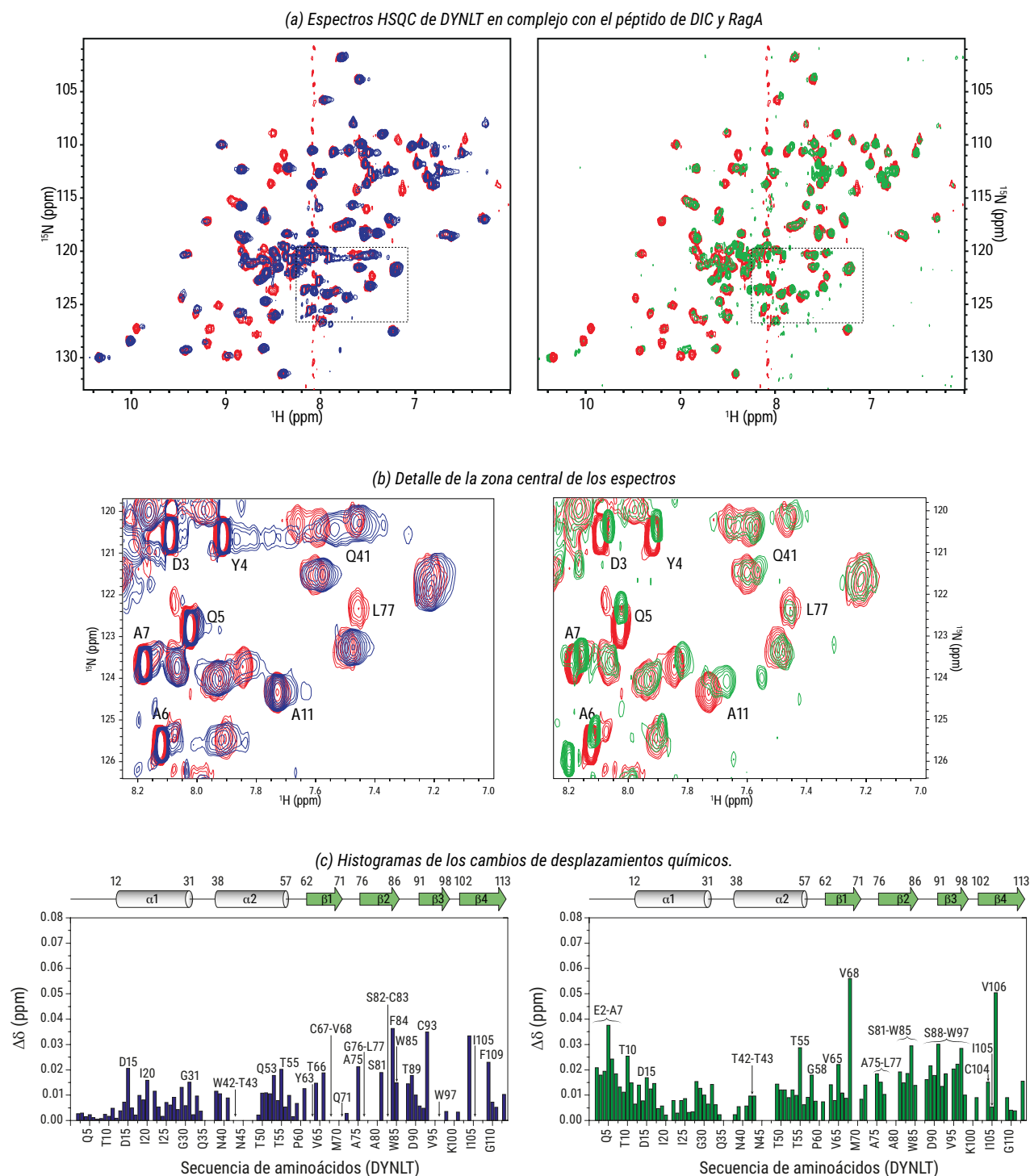


**Figura 6.17:** Espectro HSQC de la proteína DYNLT1 recombinante. La dispersión de las señales de resonancia indican una proteína perfectamente plegada. Se marcan los enlaces amida de los residuos identificados en las señales.

ven implicados en esta interacción. Los espectros de RMN muestran que los residuos alterados por la unión de la DIC, y aquellos afectados por el péptido de RagA no son solapantes, confirmando la hipótesis de que RagA se une a una diferente de DYNLT1.

Para los experimentos de RMN, se obtuvo DYNLT1 de manera recombinante, expresada en un sistema bacteriano y marcada con  $^{15}\text{N}$  (ver la sección 10.3.2), que fue purificada hasta conseguir un gran rendimiento y alto grado de pureza que permitieron la adquisición de los espectros HSQC del protón-nitrógeno ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) con una excelente señal de las resonancias de los enlaces amida del esqueleto peptídico en el rango de los desplazamientos químicos del protón, indicando que la proteína recombinante está bien plegada (Fig. 6.17). Con los diversos experimentos de RMN se obtuvieron las asignaciones de las señales del espectro HSQC, que coinciden con las determinaciones previas [161, 214].

A continuación, se utilizaron las preparaciones de  $^{15}\text{N}$ -DYNLT1, sobre la que se añadieron cantidades crecientes de los péptidos sintéticos no marcados (DIC, GVSKVTQVDFLPRE\*; RagA NLVLNL-WDCGGQDTF-ME\*) para determinar los aminoácidos de DYNLT implicados en el reconocimiento y asociación de RagA, y su comparación con un ligando bien establecido (el de la DIC). Tras la adición de los péptidos de DIC y RagA sobre  $^{15}\text{N}$ -DYNLT1, se observa una perturbación global de las reso-



**Figura 6.18:** Análisis estructural por RMN de la interacción de los péptidos de DIC (azul) y RagA (verde) con DYNLT1 (rojo en los espectros HSQC). (a) Comparación de los espectros HSQC de DYNLT1 en su forma libre y en complejo con los péptidos de DIC y RagA. Los recuadros indican el detalle en el siguiente panel. (b) Detalle de la zona central del espectro (recuadro en la figura 6.18a) en donde se ven algunas diferencias de los cambios de los desplazamientos químicos de DYNLT1 causados por la interacción de los péptidos de DIC y RagA. (c) Histograma de los cambios de los desplazamientos químicos de DYNLT1 en complejo con los péptidos de DIC. Las posiciones indicadas son relevantes en cuanto a la interacción. Aquellas que se indican pero falta la barra correspondiente es porque ha habido un ensanchamiento por intercambio. Se representan los elementos de estructura secundaria de DYNLT1.



nancias de los enlaces amida en el espectro HSQC. Estas perturbaciones pueden ser un cambio en el desplazamiento químico (i.e. movimientos de las señales,  $\Delta\delta$ ), o una desaparición de la señal debida a un intercambio dinámico entre dos estados. En el primer caso, el cambio es cuantificable, mientras que en el segundo no. Los cambios de los desplazamientos químicos se representan en la superposición de los espectros de DYNLT1 libre (rojo) y DYNLT1:DIC (azul) o DYNLT1: RagA (verde), en la figura 6.18a.

Con la adición del péptido de la DIC en proporciones 1:2 a 1:4 (proteína:péptido), las señales correspondientes a los residuos Trp42-Thr43, Tyr63, Cys67-Val68, Ile69, Gln71, Gly76-Leu77, Ser82-Cys83, Trp85, Trp97 e Ile105 se ven alterados hasta su completa desaparición (Fig. 6.18a). Estos aminoácidos se sitúan en la región previamente descrita que está implicada en la interacción de la DIC en el surco formado entre los monómeros [189].

Por otra parte, al comparar las señales de resonancia de los residuos alterados por la unión de DIC y de RagA, se puede ver que la GTPasa se une a una superficie más extensa de DYNLT1. Destacan las perturbaciones detectadas en el extremo N-terminal de DYNLT, al principio de la hélice  $\alpha_1$ , que son sustancialmente mayores en presencia de RagA que con DIC, lo que podría indicar una región de interacción específica. En las estructuras cristalográficas anteriores sin embargo, no muestran ninguna interacción entre el péptido de DIC inserto y el extremo N-terminal de DYNLT1.

Se representa en la figura 6.18c la variación de los desplazamientos químicos, alineados con los elementos de estructura secundaria de DYNLT1. Se puede ver también que hay algunos residuos que se ven sustancialmente modificados, como Val68 o Val106, que están en medio de las cadenas  $\beta_1$  y  $\beta_4$ , respectivamente.

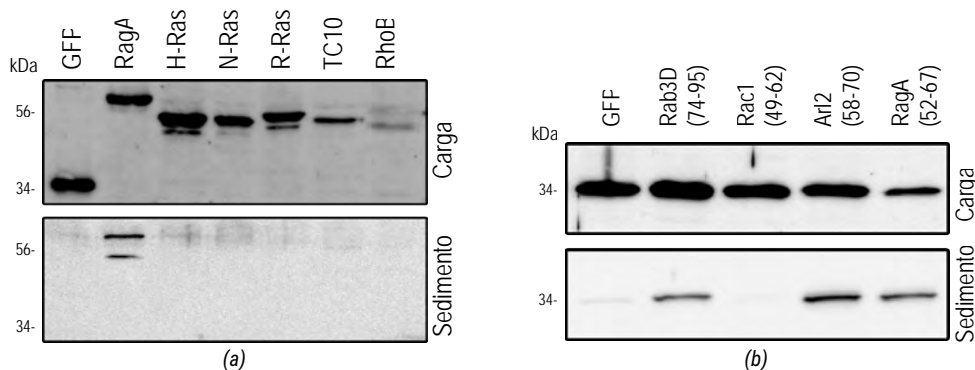
Estas observaciones implican que la interacción de RagA solapa parcialmente con el sitio de DIC, en el surco, pero se extiende hacia una superficie distinta. Aunque los datos de RMN aquí presentados muestran unos cambios en los desplazamientos químicos moderados tras la adición de los péptidos de DIC y RagA, esas observaciones son reproducibles y consistentes con los resultados globales, e indican que RagA puede estar efectivamente interaccionando en la zona del extremo N-terminal de DYNLT1. Además, también se dan algunas perturbaciones en residuos localizados internamente en la proteína, como aquellos situados en la hélice  $\alpha_1$ , que se orientan hacia el núcleo interno. Estas perturbaciones podrían reflejar algunas reestructuraciones globales de DYNLT1 tras la unión de RagA.

## 6.5. Interacción de DYNLT1 con otras GTPasas

Además de RagA, otras pequeñas GTPasas tal vez puedan interaccionar con DYNLT1 a través de su hebra  $\beta_3$ , en la misma región de la caja G3. Es bien conocido que esta región está implicada en la unión del ión de magnesio asociado al nucleótido, y es una zona altamente conservada a lo largo de la superfamilia de las GTPasas [259, 260].

Los experimentos presentados anteriormente en esta Memoria han permitido demostrar que las GTPasas RagA y Rab3D son capaces de asociarse a la cadena ligera DYNLT1 por medio de residuos

específicos en la hebra  $\beta 3$ , alrededor de la caja G3 (Fig. 6.1). Además, en el trabajo de Pavlos y colaboradores muestran cómo DYNLT1 puede unirse también a otras pequeñas GTPasas que tienen una secuencia idéntica en esta región, como los otros miembros del grupo Rab3 (Rab3A, 3B, y 3C), pero que no puede unirse a otras GTPasas, que difieren en la secuencia de esta zona (como Rab5 o Rab6L [216]).



**Figura 6.19:** Interacción de DYNLT1 con otras GTPasas. Se cotransfectaron células COS7 con lectina-DYNLT1 y las GTPasas o los fragmentos indicados, y se sedimentó selectivamente la lectina.

Dada la importancia de esta región y la conservación de su secuencias entre las GTPasas, es posible que también pueda mediar en la interacción de otros miembros de otras GTPasas con DYNLT1. Para explorar esta posibilidad, se coexpresaron en células de mamíferos diversas GTPasas fusionadas a GFP, y se analizó su interacción con DYNLT1 por su cosedimentación específica. De todas las proteínas estudiadas, sólo RagA fue sedimentada selectivamente arrastrada por la lectina-DYNLT1, indicando que la interacción es muy específica de secuencia. Las GTPasas seleccionadas del grupo Ras (N-Ras, H-Ras y R-Ras), o del grupo Rho (TC10 o RhoB) no interaccionaron con DYNLT (Fig. 6.19).

Teniendo esto en cuenta, se fusionaron a la GFP péptidos de diferentes GTPasas, abarcando la región equivalente a la descrita para RagA, tal y como se muestran en la figura 8.4. Como se puede ver en la figura 6.19b, los péptidos correspondientes a Arl2, RagA y Rab3D fueron inmovilizados selectivamente gracias a su interacción con DYNLT1. Sin embargo, Rac1 no fue detectada en el sedimento, muy probablemente a que la glicocola en posición 54 (equivalente a la Asn59) parece ser suficiente para suprimir la unión, de forma análoga a la mutación Asn59Gly de RagA (ver la figura 6.3), lo que supone un nuevo apoyo a la importancia de estas posiciones para la interacción con DYNLT1. En este contexto, cabe destacar que el mutante Asn59 de RagA también perdía la interacción.

En conjunto, los datos aquí presentados abren la posibilidad de que determinadas GTPasas pueden ser asociadas al motor de la dineína, por medio de las LCs, como un mecanismo adicional de regulación, ya sea para su transporte por los microtúbulos, su redistribución en el citoplasma, o su secuestro de los lugares de acción.





## **Parte III**

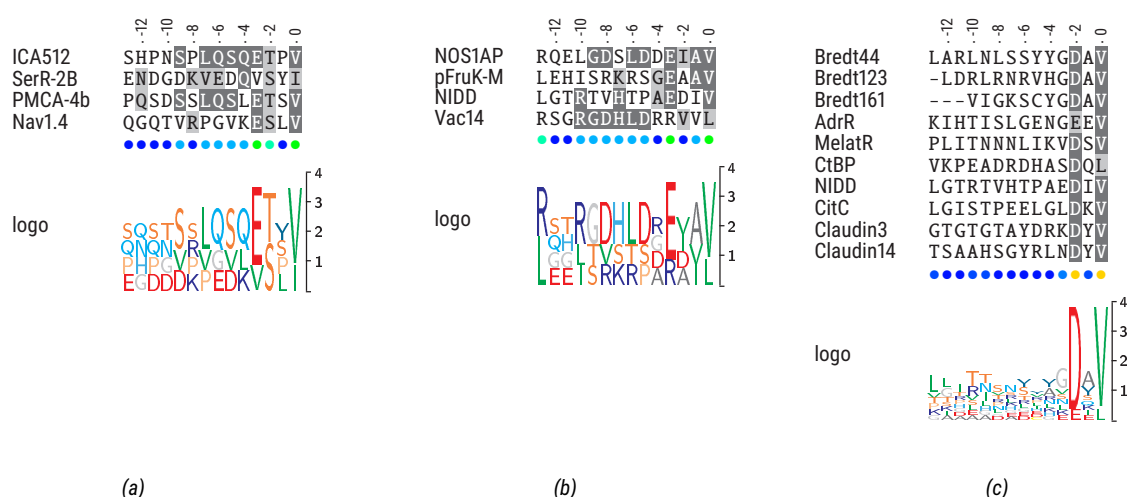
### **Discusión**



## Capítulo 7

# El dominio PDZ de la nNOS y la unión a péptidos Ct

En la nNOS, el dominio PDZ es una característica exclusiva entre las NOSs, presente en su extremo N-terminal. Comparte muchas características con otros dominios PDZ, como son su plegamiento general y la capacidad de reconocimiento de secuencias C-terminales en las que el aminoácido final es hidrófobo. Además, tiene como particularidad una extensión en el lado C-terminal del dominio, que se pliega en horquilla  $\beta$  y le proporciona la capacidad de interaccionar con PSD-95 o con la  $\alpha$ 1-sintrofina, a través de la asociación de un motivo interno con el PDZ de estas proteínas [18, 261]. La presencia de esta horquilla  $\beta$  permite el reclutamiento específico de la nNOS a regiones celulares donde puede ser necesaria su participación, a la vez que deja su propio dominio PDZ libre para seguir incorporando componentes.



**Figura 7.1:** Ligandos del dominio PDZ de la nNOS, distribuidos según la clasificación tradicional. (a) Ligandos de tipo I. (b) Ligandos de tipo II. (c) Ligandos de tipo III. El logo de secuencia muestra claramente el requerimiento obligatorio de un aminoácido hidrófobo en la posición 0, fundamentalmente valina, mientras se permite una mayor variabilidad en el resto de las posiciones.

Desde el principio, por medio de experimentos de selección por afinidad, se determinó que la se-

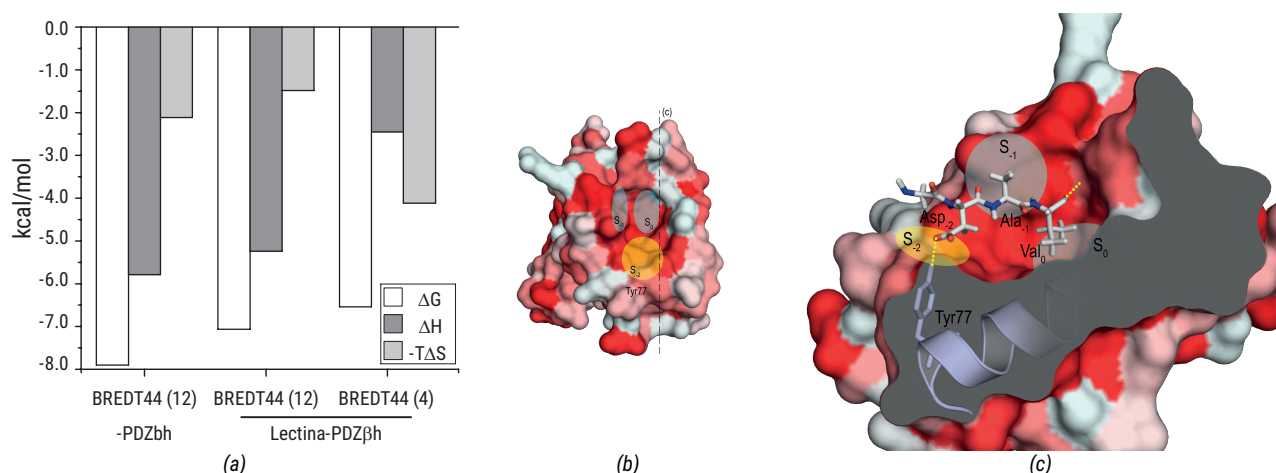
cuencia consenso que se unía al dominio PDZ de la nNOS es -GDV\* [50]. Las secuencias utilizadas en este trabajo eran péptidos generados aleatoriamente y seleccionados específicamente por afinidad, y no necesariamente corresponden a secuencias de proteínas reales, de hecho no existe ninguna proteína celular que contenga exactamente la secuencia -GDAV\* [48]. En este sentido, el dominio PDZ de la nNOS es uno de los pocos PDZ que reconoce ligandos de tipo III, aquellos que tienen el ácido en -2, y entre los ligandos descritos la mayoría pertenecen a este grupo (Fig. 7.1). No obstante, la lista de ligandos del PDZ de la nNOS incluye un espectro variado de secuencias que incluyen PBMs de tipo II, como el más estudiado CAPON/NOS1AP [51], de tipo I (como PMCA-4b [53]) e incluso alguna secuencia que se sale de estos estándares, como la del transportador de serotonina [61]. Además se incluye la posibilidad de que, además del extremo C-terminal de los ligandos, puedan insertarse en el canal secuencias internas, como fue propuesto para el receptor Vac14 [60], por lo que ha sido difícil establecer con claridad los requerimientos precisos para la interacción con el dominio PDZ de la nNOS.

Para esclarecer el comportamiento particular del dominio PDZ de la nNOS se iniciaron los estudios desarrollados en esta Tesis. Utilizando diversas técnicas *in vitro* y en ambientes celulares con el dominio PDZ de la nNOS recombinante y péptidos sintéticos, se estudiaron primeramente las secuencias de tipo III identificadas por D. Bredt. Es de esperar que estas secuencias muestren una elevada fuerza de interacción, y así se demostró, tanto en los dobles híbridos de levaduras como en los experimentos de desplazamiento de la  $T_m$ , donde destaca el desplazamiento excepcional de hasta 8 °C (Fig. 5.2). La magnitud de esta diferencia se puede correlacionar con la afinidad de la interacción [262], pero habría que partir de varias premisas, la más importante de ellas asume la reversibilidad del proceso de desnaturalización, que en el caso del dominio PDZ de la nNOS no se cumple, a la vista del precipitado de proteína que se obtiene después de los experimentos.

Por calorimetría de titulación y polarización de fluorescencia (Fig. 5.3) se confirmó unas constantes de afinidad del orden micromolar ( $K_d = 5,69 \pm 0,27 \mu\text{M}$  por FP,  $K_d = 2,23 \mu\text{M}$  por ITC). Habitualmente se calculan constantes de afinidad de este orden en la interacción entre los dominios PDZ y sus ligandos. De hecho, para las técnicas en fases sólida suelen estimarse afinidades en el rango nanomolar, mientras que los experimentos en solución proporcionan datos de afinidad más débiles, en el orden micromolar [40], por lo que estos valores obtenidos lo corroboran.

Se comparó a su vez el comportamiento de las dos especies moleculares obtenidas de manera recombinante. El problema con el dominio PDZ de la nNOS era que el paso de proteólisis es extremadamente lento, y la digestión que normalmente se completaba al 100 % en 24 o 48 h, en el caso del dominio PDZ necesitaba más de una semana para completarse. Como se puede ver en la figura 5.4, se comprobó que la afinidad de las dos especies, lectina-PDZ $\beta$ h y PDZ $\beta$ h cortada era muy semejante ( $K_d = 1,32$  y  $2,23 \mu\text{M}$  respectivamente), por lo que se podían utilizar cualquiera de las dos especies.

Con estas secuencias de tipo III secuencia descrita se procedió a su vez a intentar establecer la longitud mínima necesaria para que haya una interacción con el dominio PDZ de la nNOS. Mediante calorimetría y dicroísmo circular se estudió la interacción del péptido -GGDAV\*, el cual contiene



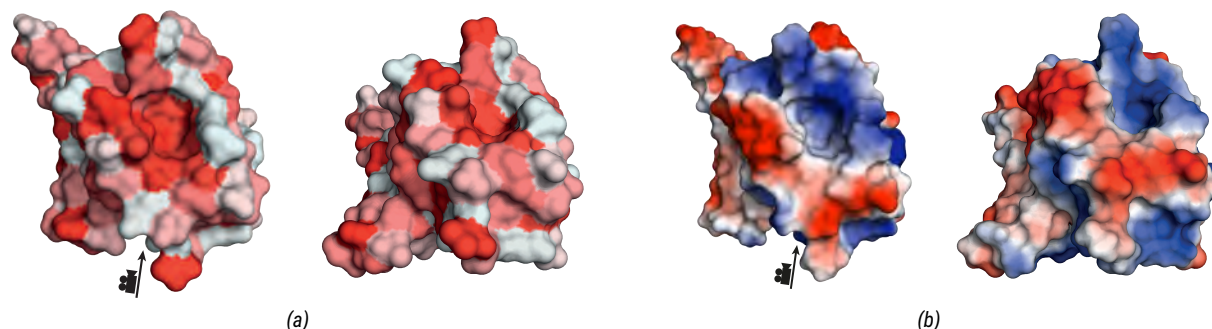
**Figura 7.2:** Interacción de los péptidos de Bredt al PDZ de la nNOS. (a) Perfil termodinámico obtenido por ITC. Se ve la similitud entre la proteína lectina-PDZ $\beta$ h y el dominio PDZ solo y la diferencia en el mecanismo del péptido largo con respecto al corto. (b) Representación de la superficie del sitio de unión del dominio PDZ de la nNOS, coloreado según el índice de hidropatía. A más rojo, más hidrofóbico. Se puede ver el carácter hidrófobo del bolsillo de unión. La línea de puntos representa el perfil de (c) (c) modelo de la interacción de los cuatro últimos aminoácidos de Bredt44 (-GDAV\*) sobre la superficie del dominio PDZ de la nNOS, tomando como referencia la posición del ligando (R. melatonina) en la estructura por RMN, 1B8Q [52].

únicamente los cuatro últimos residuos de un posible consenso. En la figura 5.2 se ve que ambos péptidos se unen al dominio PDZ de la nNOS, y que ambos modifican la  $T_m$  en la misma magnitud, unos 8 °C. Sin embargo, al analizar esta interacción por calorimetría, en iguales condiciones el péptido más corto da lugar a una afinidad menor, lo cual no es incompatible con el dato previo. En los análisis de la  $T_m$  por dicroísmo circular se fuerza experimentalmente la formación del complejo aplicando una concentración de péptido de 0.5 mM, desplazando el equilibrio al máximo. Esto quiere decir en la práctica que la interacción es todo o nada, y aunque la afinidad del péptido más corto sea efectivamente más baja, no se detecta esa diferencia. Por el contrario, con la técnica de ITC se va titulando el péptido sobre la proteína, y el equilibrio se va desplazando paulatinamente, dando lugar a una mayor sensibilidad de discriminación.

Por otro lado, ambos péptidos se unen con un perfil termodinámico diferente, representado en la figura 7.2a. Puede verse que el péptido largo, independientemente de a qué especie molecular se una, tiene una interacción dirigida entálpicamente, mientras que el péptido corto tiene una contribución entrópica. Se demuestra así que la secuencia mínima imprescindible es de 4 aminoácidos (-GDAV\*), cuya asociación se rige fundamentalmente por interacciones hidrófobas. Como se puede ver en la figura 7.3a, la aportación de la interacción del grupo carboxilato del extremo puede quedar enmascarada por la gran superficie hidrófoba de los sitios  $S_0$  y  $S_{-1}$ . En el péptido largo, al haber una mayor cantidad de residuos y muchos de ellos más polares, se aumenta la posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno y puentes salinos, que contribuyen más de forma entálpica.

En la figura 7.3b se puede ver la distribución electrostática del dominio PDZ, y se puede ver que la zona correspondiente al bucle que conecta la cadena  $\beta 2$  con la hebra  $\beta 3$  tiene algunos residuos polares

que podrían contribuir a la formación de puentes de hidrógeno con los aminoácidos más internos de la secuencia del péptido de Bredt44, que explicarían el aumento de la componente entálpica.



**Figura 7.3:** Características de la superficie del dominio PDZ de la nNOS, vistas cenital y frontal (flecha). (a) Hidrofobicidad, según el perfil de hidropatía de los aminoácidos [153]. (b) Potencial electrostático, calculado con APBS [263, 264].

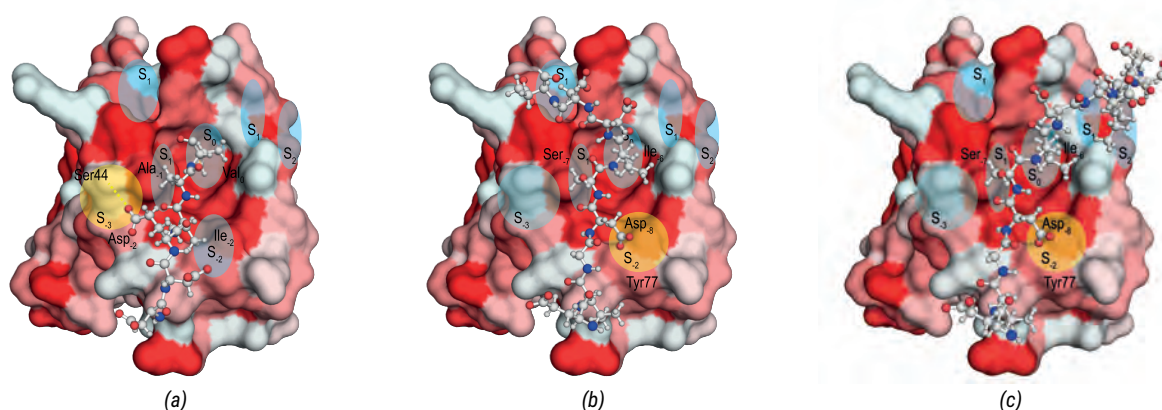
Así, la interacción del dominio PDZ de la nNOS con los péptidos artificiales de Bredt, y por tanto a las secuencias de tipo III queda confirmada y caracterizada. Su afinidad está en concordancia con las observaciones previas de los niveles de alta afinidad de los dominios PDZ medidas en solución, y los cuatro últimos aminoácidos son suficientes para permitir la asociación, aunque es posible que secuencias más largas favorezcan dicha interacción, o participen en un reconocimiento más específico.

Una vez caracterizada la formación del complejo entre el dominio PDZ de la nNOS y un conjunto de péptidos artificiales, se procedió al estudio de las interacciones reales. La proteína de la que más bibliografía se ha publicado en relación a la interacción con el dominio PDZ es la proteína NOS1AP/CAPON [51]. En la sinapsis, la nNOS forma parte de un complejo ternario con el receptor de N-metil-D-aspartato a través de la proteína PSD-95 ([16], Fig. 2.4b), estando de esta forma en proximidad con el flujo de calcio inducido por la activación glutamatérgica del canal [265] y siendo la principal conexión con la muerte neuronal por sobre-excitación [266]. Además de las funciones fisiológicas en la excitación neuronal, este mecanismo está detrás de la excitotoxicidad en situaciones patológicas, como la isquemia o las enfermedades neurodegenerativas, donde se produce una muerte neuronal generalizada, liberación descontrolada de glutamato (entre otros), y la producción exacerbada de  $\cdot\text{NO}$ , y con ello, más muerte neuronal [267].

La interacción del dominio PDZ de la nNOS con el dominio PDZ2 de PSD-95 está mediada por su extensión C-terminal, la horquilla  $\beta$  [49], lo que deja libre el bolsillo canónico para la inserción de otros extremos C-terminales. Entre estas posibilidades está la proteína NOS1AP, que con su secuencia C-terminal (-SLDDEIAV\*) se engloba en el grupo de PBMs de tipo II. Parece ser capaz de insertarse en el surco del dominio PDZ de la nNOS y participar en conjunto en diversos procesos en tejido neuronal y muscular [268], aunque la confirmación de que efectivamente se inserta el extremo C-terminal de NOS1AP en el PDZ de la nNOS parece ser elusiva. La participación de NOS1AP en las rutas de excitotoxicidad por  $\cdot\text{NO}$  parecen estar mediadas por su conexión con la ruta de p38MapK [269], y en general, en aquellos procesos fisiológicos y patológicos donde participa el óxido nítrico, parece estar siempre el adaptador NOS1AP [270].

Como el mecanismo de esta interacción aún está por definir, se realizó una caracterización en profundidad. En teoría, el extremo C-terminal de NOS1AP constituye un PBM de tipo II, y podría ser el motivo para la inserción en el dominio PDZ de la nNOS. Se comenzó con un análisis preliminar con dobles híbridos de levadura, aunque esta vez se siguió un procedimiento ligeramente distinto. Después de clonar el fragmento correspondiente a los últimos 12 aminoácidos ([EL]-GDSLDEIAV\*), se sustituyeron posiciones individuales hasta el residuo -9 del ligando por alanina para perfilar la especificidad. Se recogen en la tabla 5.3 los resultados representativos de los ensayos de interacción en las levaduras. A falta de terminar con las construcciones, pues se están clonando a la vez que la realización de esta Memoria, los resultados preliminares indican que la sustitución de la valina C-terminal, como era de esperar, es suficiente para eliminar la interacción. Sin embargo, se vio de manera sorprendente que la sustitución del glutámico en posición -2, el cual es el identificador de la clase no produzca el mismo efecto, ya que cabría esperar que su sustitución afectara sustancialmente a la interacción. También se vio de manera inesperada que la alteración de residuos más internos en la secuencia del ligando sí que afectaba a la interacción, concretamente la sustitución de Ile<sub>-6</sub> por Ala eliminó por completo la unión, mientras que el cambio de Asp<sub>-8</sub> produjo un leve descenso de la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

Esto puede ser indicativo de dos situaciones: por un lado que el hecho de que el identificador de que la secuencia sea de tipo II no sea determinante para la interacción con el dominio PDZ de la nNOS, por tanto debe haber otros residuos de la secuencia, además de la valina en P<sub>0</sub>, que cumplan con esta función. Uno de estos debe ser la posición P<sub>-3</sub> (DDEIAV\*), un residuo ácido que aparece repetitivo en varias secuencias de unión a PDZ, y experimentos realizados muy recientemente indican que este aminoácido es clave para la interacción. Por otro lado, la participación de las secuencias más internas que supondría la necesidad de una interacción accesoria en otra superficie del dominio PDZ, o la inserción en el sitio canónico de esa secuencia interna.



**Figura 7.4:** Modelos de la interacción de los péptidos de NOS1AP. (a) Se pueden definir fácilmente los sitios de unión en el PDZ ( $S_0$ ,  $S_{-1}$ ,  $S_{-2}$ ,  $S_{-3}$  en donde se acomodarían los residuos Val<sub>0</sub>, Ala<sub>-1</sub>, Ile<sub>2</sub> y Asp<sub>-3</sub> respectivamente, pero no es tan fácil poder afirmar cuáles serían los sitios de unión  $S_1$  o  $S_2$ . Una vez que Ile<sub>0</sub> se coloca en  $S_0$ . El pseudopéptido de tipo III formaría un puente de hidrógeno entre Asp<sub>-8</sub> y Tyr77, y se podrían definir dos orientaciones: I, el resto de los aminoácidos se colocan hacia la izquierda (b) o II, se colocan hacia la derecha (c).



Antecedentes de estas posibilidades han sido descritas anteriormente, y el dominio PDZ de la proteína que interacciona con PKC-1 (*Protein Interacting with C-Kinase 1*, PICK1) parece que también se puede comportar así [249]: diferentes secuencias se insertan en el mismo sitio de forma diferente, y puede que la secuencia C-terminal de NOS1AP siga un modelo similar.

Sin embargo, se confirmó en los experimentos de desplazamiento de la  $T_m$  que la secuencia -DDEIAV\* es suficiente para que haya interacción, aunque sea de tan baja afinidad que necesite de las secuencias accesorias, o incluso de regiones más internas para mantener una interacción *in vivo*.

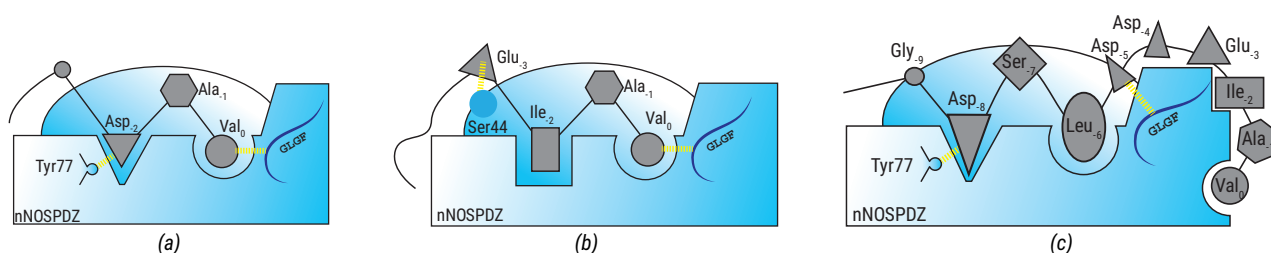
En este caso se tienen cuatro experimentos con resultados que en principio parecen contradictorios. Ya en el doble híbrido se vio que los residuos más internos podrían ser importantes para la interacción, porque sustituyendo la Ile<sub>-6</sub> se perdía por completo la capacidad de unión. Del mismo modo, el cambio de Asp<sub>-8</sub>, aunque no evitaba la interacción por completo, sí que reducía su intensidad. Esto concuerda con dato del calorímetro de que la eliminación de los residuos N-terminales tampoco tiene una interacción detectable. Sin embargo, los experimentos de CD parecen indicar que sí que hay unión en los tres casos, pero esto puede deberse nuevamente a las condiciones experimentales, ya que en este experimento se vuelve a tener totalmente desplazado el equilibrio hacia la formación del complejo, y por baja que sea la afinidad, se está siempre en una situación de saturación. Por ITC, simplemente está fuera del rango de sensibilidad, y puede que aplicando mayores concentraciones, tanto de péptido como de proteína, se pueda utilizar esta técnica.

Estos resultados entran en clara contradicción con los publicados muy recientemente por el grupo de M.J. Courtney, en el que se afirma que la interacción entre el dominio PDZ de la nNOS y NOS1AP mediada por el extremo C-terminal es de muy baja afinidad, mientras que se obtiene un complejo estable con la proteína completa, identificando un motivo interno (región 400-431), que dista unos 80 aminoácidos del extremo C-terminal de NOS1AP [271]. En los resultados aquí mostrados, sin embargo, se demuestra por varias técnicas (dobles híbridos de levadura, polarización de fluorescencia, CD, ITC y RMN) que los últimos 12 aminoácidos de NOS1AP son suficientes para dirigir la unión. Sin embargo, sí que puede ser cierto que la presencia de otra interacción adicional pueda favorecer la estabilidad del complejo y la falta de interacciones y las bajas afinidades encontradas pueda deberse a ello.

Se puede tratar de definir un modelo similar al que establecieron para el dominio PDZ de PICK1 [249]. Se podrían definir sobre el dominio PDZ varios sitios de unión (S) de forma equivalente a PICK1. La proteína NOS1AP tendría dos sitios de interacción consecutivos, los cuales actúan de manera secuencial. Primero entra la primera secuencia, los cinco últimos aminoácidos con un motivo de tipo II, en la que Val<sub>0</sub> se inserta de la forma canónica en el bolsillo hidrófobo, pero que después se recolocaría, se desplazaría varios aminoácidos y colocaría la Ile<sub>-6</sub> en el bolsillo hidrófobo pasando a ser la posición 0, a la vez que Asp<sub>-8</sub> quedaría colocado en una nueva posición -2 (Fig. 7.4). De hecho, esta nueva secuencia interna, ya de por sí se asemeja a un PBM de tipo III (-ELGD<sub>-2</sub>SL<sub>0</sub>DDEIAV). Por otro lado, se vio por ITC que la interacción del péptido que incluía esta secuencia interna estaba dirigida entálpicamente, probablemente gracias a la formación de enlaces polares, los cuales que pue-

den adivinarse por la alta proporción de residuos ácidos que tiene el péptido y que pueden establecer con la superficie del sitio de unión, que tiene una polaridad positiva (Fig. 7.3).

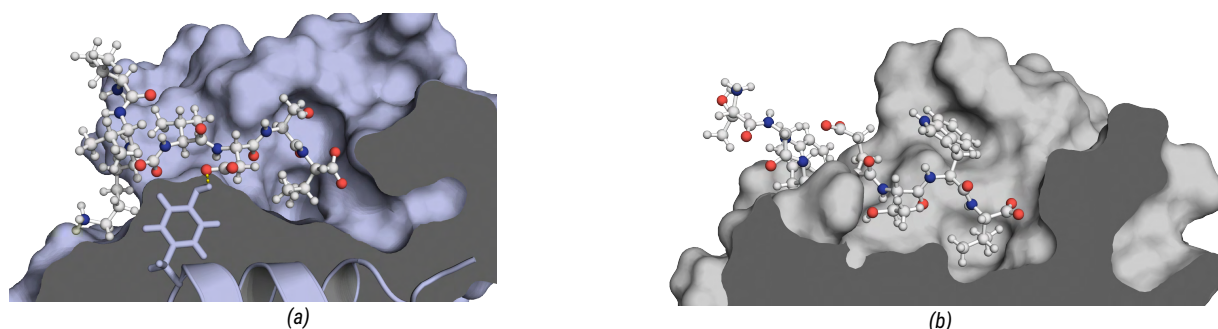
Ésto también podría explicar el porqué de que la presencia de la sonda fluorescente puede estar afectando a la interacción en el ensayo de polarización. La sonda está conjugada en el extremo N-terminal del péptido, el cual comienza en la posición -8. El FITC es una molécula grande que puede estar interfiriendo en este movimiento del péptido, y aunque hay unión, no permite que se mantenga unido con fuerza.



**Figura 7.5:** Modelos posibles sobre las interacciones de los péptidos al dominio PDZ, vista de perfil. (a) Los péptidos de Breddt. (b) NOS1AP al insertar el extremo C-terminal en el sitio canónico. (c) NOS1AP al insertar la secuencia interna en el sitio canónico.

Como se ha comentado anteriormente, ambos contienen una valina en el extremo, y producen una alteración de los desplazamientos químicos correspondientes a los aminoácidos de la base del sitio canónico de interacción. El sitio de la valina ( $S_0$ ) es un lecho hidrófobo formado por las cadenas laterales de los aminoácidos del lazo -GLGF- y los primeros de la cadena  $\beta 2$  (Leu28, Phe30 y Val32), y por el otro lado, la Leu84 al final de la hélice  $\alpha 2$ , la Ile 87 en el bucle de conexión y la Val93 y Leu95, en la hebra  $\beta 5$ . Este ambiente hidrófobo permite la entrada de cadenas laterales de estas características, cuya especificidad viene dada no tanto por la formación de enlaces concretos, sino por un efecto estérico [252]. En este sentido, el dominio PDZ de la nNOS es similar al de ERBB2IP, donde la Phe25 del lazo -GLGF- está colocada en la misma orientación y permite la entrada de una Val<sub>0</sub>. Esto ha sido confirmado con el análisis preliminar de los espectros HSQC. En la figura 5.10 se puede ver el efecto de la interacción de los péptidos Breddt44 y NOS1AP en la distribución de los desplazamientos químicos del dominio PDZ de la nNOS. Aunque aún no ha sido posible identificar en la maraña de señales aquellas correspondientes al lazo -GLGF-, sí se han asignado las correspondientes a la zona profunda del bolsillo. Se puede ver que tanto Leu84 como Ile87 se ven profundamente afectadas por la interacción. Val93 y Leu95 no se han señalado, pero sí Val94, la cual está orientada hacia el otro lado de la cadena  $\beta 5$ . Val94 también se ve ligeramente distorsionada, con una perturbación del desplazamiento químico considerablemente menor pero, al encontrarse apuntando hacia otra superficie del dominio, esta perturbación puede deberse a reajustes conformacionales de los aminoácidos que están antes y después más que a una interacción hidrófoba directa. Sólo hay publicada una estructura tridimensional en el PDB de un dominio PDZ con un ligando, un péptido procedente del receptor de melatonina (PDB ID: 1B8Q [52]). En esta estructura se puede ver que Val<sub>0</sub> se coloca en la misma orientación que Val<sub>0</sub> en la estructura de ERBB1IP comentada anteriormente (Fig. 7.6), por lo que es

previsible que en los casos estudiados aquí ocurra lo mismo, y los datos obtenidos hasta el momento parecen confirmar esta premisa.



**Figura 7.6:** La interacción de la valina en el extremo C-terminal. En estos cortes laterales se muestra la interacción del receptor de melatonina con el dominio PDZ de la nNOS (a) y el dominio PDZ unido a un péptido derivado de un fago (–TGWETWV\*) (b). Se puede ver cómo en ambos casos la valina se coloca en la misma orientación. En (a) se representa a su vez la Tyr77 que reconoce a Asp<sub>–2</sub>.

Bredt44 es un péptido de tipo III, y como tal contiene un residuo ácido en la posición –2, mientras que NOS1AP es una proteína cuyo extremo pertenece a los PBMs de tipo II, por tener en P<sub>–2</sub> un aminoácido hidrófobo, aunque también tiene un ácido en posición –3. Sin embargo no es posible establecer una preferencia clara hacia un tipo u otro de secuencias, porque el dominio PDZ de la nNOS parece permitir la entrada de ambos tipos, incluso de algunos de tipo I. Está bien establecido que los aminoácidos en las posiciones  $\beta$ 2-2 y  $\alpha$ 2-1 son los que permiten una primera selectividad en la asociación de los péptidos, al reconocer específicamente el residuo P<sub>–2</sub>. Prácticamente todos los dominios PDZ que unen secuencias de tipo I tienen una histidina en  $\alpha$ 2-1 (His <sub>$\alpha$ 2-1</sub>) que forma un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo de Ser/Thr<sub>–2</sub>. En este sentido, se han determinado algunas estructuras tridimensionales de dominios PDZ que reconocen péptidos de tipo III pero no ayudan a definir un patrón común: la estructura del dominio PDZ3 de ZO1 (PDB ID: 4Q2Q) tiene la Arg436 <sub>$\beta$ 2-2</sub> y la Arg480 <sub>$\alpha$ 2-1</sub> en esas posiciones clave, pero en lugar de enlazar con la cadena lateral de Asp<sub>–2</sub> como cabría esperar, lo hacen con el esqueleto peptídico, induciendo un giro en la hebra  $\beta$  produciendo que el péptido se inserte en una orientación poco usual y haciendo gala de una elevada promiscuidad de reconocimiento. Mientras tanto, el dominio PDZ10 de MUPP1, a pesar de que se sabe que reconoce el extremo de la claudina 1 (–SSGKDYV\*) [63], la estructura existente en el PDB (PDB ID: 2OPG) tiene insertada una secuencia de tipo I (–PYKSTRL\*), a la vez que un estudio termodinámico en profundidad que define la preferencia de este dominio PDZ por péptidos con Ser/Thr<sub>–2</sub> [272]. La presencia de una His <sub>$\alpha$ 2-1</sub> podría explicar esta preferencia, y la interacción con la claudina 1 podría ser una excepción.

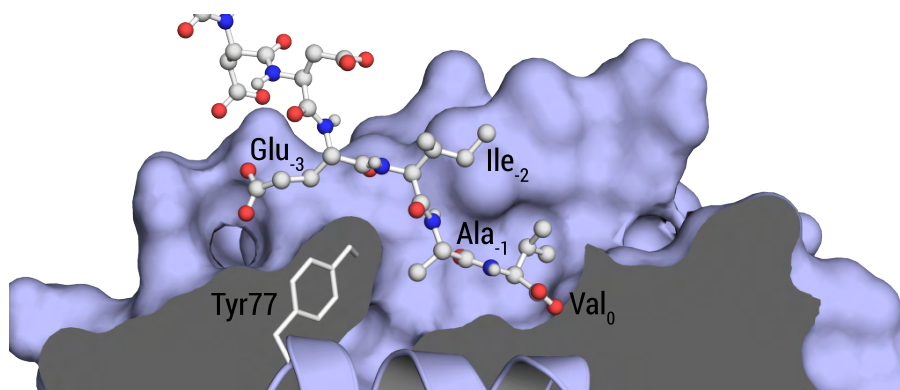
Sin embargo, la estructura del dominio PDZ de la nNOS con el péptido del receptor de melatonina puede arrojar algunos datos interesantes. El receptor de melatonina tiene en su extremo un PBM de tipo III (–IKVDSV\*). En la posición  $\alpha$ 2-1, el dominio PDZ de la nNOS tiene una tirosina (Tyr77 <sub>$\alpha$ 2-1</sub>), cuyo carácter más electrofílico determina la mayor preferencia por un grupo carboxilo que por un hidroxilo [50]. En efecto, Tyr77 <sub>$\alpha$ 2-1</sub> forma un puente de hidrógeno con el ácido aspártico de la posición P<sub>–2</sub> del receptor de melatonina [52] (Fig. 7.6a), por lo que se podría esperar una interacción similar

en el caso de Bredt44. Esta interacción se detectó específicamente en los espectros HSQC (Fig. 5.12). Por el contrario, la otra posición que suele fijar esta  $P_{-2}$  al otro lado del surco de unión, en la hebra  $\beta_2$  suele ser un aminoácido polar, pero que en el caso del dominio PDZ de la nNOS, está ocupada por la Leu31 $_{\beta_2-2}$  que genera una superficie hidrófoba. Este aminoácido serviría para favorecer la entrada de secuencias que tienen residuos alifáticos en  $P_{-1}$  o  $P_{-2}$ , como la Ala $_{-1}$  de Bredt44 y Ala $_{-2}$  de NOS1AP.

Por su parte, el péptido de NOS1AP tiene una secuencia de tipo II, con un aminoácido hidrófobo en  $P_{-2}$  y uno ácido en  $P_{-3}$ . Para tratar de entender como hace para reconocer también este tipo de péptidos, nuevamente se comparó el dominio PDZ de la nNOS con estructuras de dominios PDZ que reconocen estas características, particularmente el ácido  $P_{-3}$ . La mayor parte de estas estructuras reconocen secuencias de tipo I, que tienen una Ser/Thr en  $P_{-2}$ , por lo que suelen tener la His $_{\beta_2-1}$ . Además, destaca la existencia de aminoácidos polares en la cadena  $\beta_3$  que reconocen al aminoácido negativo de  $P_{-3}$ . Normalmente se encuentra un residuo básico en  $\beta_3-5$  que contrarresta la carga negativa proporcionada por el péptido, pero hay veces que en su lugar hay otro aminoácido, por lo que la interacción pasa al residuo anterior, una serina [252]. En el dominio PDZ de la nNOS, la posición  $\beta_3-5$  está ocupada por un ácido aspártico (Asp45 $_{\beta_3-5}$ ), una carga negativa que contrasta con lo que se puede encontrar en otras proteínas y probablemente se oriente hacia otro lado para permitir la entrada del péptido. Pero el aminoácido anterior, la serina 44 sí está más en consonancia con las posiciones equivalentes. De hecho, al inspeccionar la estructura con el receptor de melatonina se puede ver que la serina está próxima a la posición  $-3$  del ligando, el mismo lugar que ocuparía el residuo negativo. Esto se pudo confirmar con el espectro HSQC del dominio PDZ en complejo con el péptido de NOS1AP (Fig. 5.14a). Desafortunadamente no se pudo detectar directamente la Ser44, pues su señal espectroscópica en la forma libre desaparece al añadir el péptido. Por ello, se buscó la alteración de los residuos cercanos, y se encontró que los aminoácidos que preceden a Ser44, Ile42 e Ile43, sufren una perturbación de sus desplazamientos químicos en 0.11 y 0.10 ppm, respectivamente, cambio que no se detecta en igual magnitud cuando se forma el complejo con el péptido de Bredt (Fig. 5.14b).

Además de este residuo, también suele participar otro en la cadena  $\beta$ , un residuo de Ser o Asn que podrían formar otro puente de hidrógeno con este ácido en  $P_{-3}$ , pero que, como ya se vio anteriormente, está sustituido por una leucina (Leu31) en la nNOS. Sin embargo también se vio una distorsión en la Tyr77 del dominio PDZ de la nNOS ante la presencia del péptido de NOS1AP, lo que no debería ocurrir porque esta posición es específica del ácido en posición  $P_{-2}$ . En algunos de los experimentos descritos anteriormente, se intuyó la posibilidad de que la secuencia de NOS1AP podría ser doble, y que tras la entrada del extremo C-terminal y la inserción de Val $_0$  en el sitio  $S_0$ , el péptido podría sufrir un reajuste, de tal forma que Ile $_{-6}$  pasaría a ocupar el sitio  $S_0$  a modo de pseudopéptido [18], y a continuación se establecerían las interacciones de un péptido de tipo I con la secuencia interna (-RQELGDSL $_{-6}$ DDEIAV\*), en la que Asp $_{-8}$  podría enlazar la tirosina 77 de la nNOS de la misma forma que los péptidos de tipo III, mientras el extremo C-terminal establece otras interacciones no identificadas en la superficie del dominio PDZ. El lazo de unión del carboxilato podría quedar

satisfecho con el grupo carboxilato proporcionado por el residuo ácido presente a continuación, en la posición  $P_{-5}$ . Esta misma secuencia interna ( $-X-G-[D/E]-X-\Phi-[E/D]-$ ) se puede identificar en otras proteínas que interaccionan con el dominio PDZ de la nNOS, como el receptor 2B de serotonina ( $-GDKV_{-7}E$  o Vac14  $-GDHL_{-6}D$ ), para los cuales también se propuso esta posibilidad [60], y podría suponer un mecanismo adicional para el reclutamiento de proteínas al mismo complejo.



**Figura 7.7:** Modelo tridimensional del péptido de NOS1AP insertándose en el sitio canónico del PDZ, creado con el programa HADDOCK [273, 274]. Se puede ver cómo la valina del extremo C-terminal está orientada al revés de como se vería en las estructuras depositadas, la alanina en posición  $-1$  también está orientada al revés, lo que hace que el péptido en conjunto esté desplazado. El ácido glutámico ( $P_{-3}$ ) está más lejos de la tirosina 77 del dominio PDZ.

Para ver si esta posibilidad es posible, se intentó calcular un modelo de inserción del péptido mediante el programa HADDOCK [273–275], para intentar modelar la conformación del péptido de NOS1AP sobre el dominio PDZ de la nNOS a partir de los datos de cambios de los desplazamientos químicos de los espectros de RMN. Los modelos, muy preliminares, no permiten predecir que el péptido se pueda insertar con la secuencia interna (Fig. 7.7). De hecho, el modelo generado en el que se inserta el extremo C-terminal no es fiable, pues la orientación de la cadena lateral de la valina queda expuesta al disolvente.

La importancia de estas posiciones en el dominio PDZ de la nNOS se puso de manifiesto con los experimentos mutacionales, en donde se sustituyeron los aminoácidos Ser44 y Tyr77 por alanina. Se produjeron estos mutantes de forma recombinante, y se estudió la interacción con el péptido fluorescente de Bretd123, con el cual ya se había obtenido un perfil de interacción bastante preciso. Se pudo comprobar que la mutación de Tyr77, que determina la inserción de péptidos de tipo III, reduce considerablemente, aunque no elimina, la interacción del péptido. La figura 5.15 muestra la reducción de la afinidad del péptido fluorescente frente al mutante Tyr77Ala medida por polarización de la fluorescencia ( $K_d \approx 45 \mu M$ ), y puede verse también que la sustitución Ser44Ala, que controla la interacción del ácido en  $P_{-3}$  no tiene un efecto negativo sobre la interacción del mismo péptido. A continuación habría que realizar el mismo experimento con el péptido fluorescente de NOS1AP para describir con claridad la función de estos aminoácidos. Tal y como se ha realizado en otros análisis estructurales, la mutación selectiva de los aminoácidos del sitio de unión del dominio PDZ pueden ayudar a entender un poco mejor el proceso de la interacción, y se podría ir modulando la selectividad

o la afinidad a diferentes secuencias de ligandos mediante la sustitución dirigida, ya no solo por la formación de los enlaces específicos, sino por la modificación de las superficies de interacción [252].

Poniendo en común todo lo descrito hasta ahora, la secuencia de aminoácidos del dominio PDZ de la nNOS parece estar diseñada de manera que en la posición en P<sub>-2</sub> se acepten cadenas laterales de muchos tipos, tanto de residuos ácidos (Asp, Glu) como de residuos hidrófobos, definiéndolo como un dominio mixto. Este comportamiento híbrido permite una interacción con péptidos que tienen un ácido en la posición -2 gracias a la Tyr77, con aminoácidos hidrófobos en -2, gracias al ambiente hidrófobo proporcionado por Phe30, Leu31, Val32, Leu84, Ile87, Val93 e Ile95, y puede unirse residuos ácidos en -3 gracias a la Ser44, mostrando así una promiscuidad excepcional. Será necesario ampliar estos análisis con péptidos de tipo I para identificar qué aminoácidos intervienen en el anclaje de la Ser/Thr<sub>-2</sub> del extremo de proteínas como PMCA-4b, o aquellas con secuencias más raras, como la del transportador de serotonina, que tiene una Asn<sub>-2</sub>. En el primer caso (-SLE<sub>-3</sub>T<sub>-2</sub>SV\*) se podría anticipar una interacción que utilice los dos mecanismos descritos, un puente de hidrógeno entre Tyr77<sub>β3-5</sub> y Ser<sub>2</sub> y otro entre Ser44<sub>β2-2</sub> y Glu<sub>-3</sub>, mientras que en el segundo (-PCGDIRM<sub>-3</sub>N<sub>-2</sub>AV\*), podría formarse un puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de Tyr77<sub>β3-5</sub> y el oxígeno carbamídico de Asn<sub>-2</sub>, a la vez que la metionina interaccionaría con el ambiente hidrófobo de Ile42 y 43.

Una vez sentadas las bases que dirigen la interacción de los ligandos, pero manteniendo una amplia especificidad, se estudió el comportamiento de las diferentes proteínas que interaccionan con el dominio PDZ de la nNOS que se pueden encontrar en la literatura. Las secuencias C-terminales de las proteínas descritas son variadas, y aunque la mayoría de ellas configuran PBM de tipo III, se pueden encontrar secuencias de tipo II (como NOS1AP o PFK-M) e incluso de tipo I (como PMCA-4b). Aunque se pueden realizar los mismos estudios estructurales con péptidos derivados de estas proteínas, las restricciones de tiempo y material hacen que esta posibilidad pueda darse pero en un plazo de tiempo mayor al de la finalización de esta Tesis, pero se puede tratar de extrapolar los conocimientos estructurales obtenidos por RMN e integrarlos con todos los datos que se pudieron obtener de manera indirecta.

Se iniciaron así un conjunto de experimentos de interacciones entre el dominio PDZ de la nNOS y las otras proteínas, empezando primero con aquellas secuencias de tipo I, en concreto derivadas de la ATPasa dependiente de calcio (*Plasma Membrane Calcium/calmodulin-dependent calcium ATPase*, PMCA-4b). Los transportadores PMCA-4b son bombas de calcio que actúan regulando las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> intracelular, su interacción con la nNOS es relevante desde el punto de vista de la formación de un complejo similar a aquel formado por el receptor de NMDA y la nNOS (en este caso, indirectamente) [56] solo que a la inversa, puesto que PMCA-4b se dedicaría a retirar Ca<sup>2+</sup> y a reducir la actividad de la nNOS, y de esta forma, modular la señalización en la que interviene el •NO. Los experimentos desarrollados con el extremo C-terminal de esta proteína van desde los dobles híbridos de levaduras hasta la caracterización termodinámica por ITC.

El experimento en las levaduras ([EF]-PQSDSSLQSLETSV\*) dejó un resultado poco concluyente,

pues la aparición de un precipitado azul más allá de los tiempos normales del ensayo dejó una respuesta ambigua. Sin embargo, el desplazamiento de la  $T_m$  causado por la interacción de un péptido sintético (-SSLQSLETSV\*) al dominio PDZ recombinante despejó las posibles dudas al detectarse una variación de la  $T_m$  con respecto al dominio libre de unos 2 °C, un pequeño cambio que podría indicar una fuerza de interacción de poca intensidad. Esto se confirmó por medio de los experimentos de polarización de fluorescencia (Fig. 5.17a), donde se puede ver que la afinidad obtenida cae en torno a los 250  $\mu$ M, que al compararla con el resultado obtenido por calorimetría se puede tratar de entender el por qué. El termograma y la isoterma de unión de la titulación por ITC están recogidos en la figura 5.17b y se puede ver que la afinidad obtenida por este método está alrededor de 60  $\mu$ M, bastante diferente a lo obtenido en el ensayo de fluorescencia. A semejanza del péptido de NOS1AP, donde la sonda fluorescente conjugada podía estar interfiriendo negativamente en la interacción, el uso de un péptido demasiado corto para PMCA-4b (*f*-SSLQSLETSV\*) y el choque estérico de la sonda también puede ser la causa de la reducida afinidad observada por este método. Más aún, en el extremo C-terminal de PMCA-4b puede intuirse un patrón similar a la secuencia interna descrita anteriormente (-PQSDSSLQSLETSV\*), en donde la glutamina tendría que suplir de algún modo la ocupación del lazo de unión del carboxilato. Las interacciones de baja afinidad son problemáticas para su estudio por calorimetría, debido a las grandes cantidades de reactivos necesarios. La realización de nuevos experimentos de calorimetría con mayores concentraciones de proteína y péptido podría servir para obtener un perfil termodinámico más preciso.

El análisis preliminar del resto de las proteínas publicadas introduce más incertidumbre al problema de la especificidad del dominio PDZ de la nNOS. Se realizaron ensayos de interacción en levaduras mediante la técnica del doble híbrido, que en todos los casos dio negativa, aunque en algunos de ellos se obtuvo un resultado ambiguo al detectarse nuevamente una actividad  $\beta$ -galactosidasa residual, que, debido a que no aparece en los controles negativos, no pueden ser calificados de interacciones negativas. La formación de complejos entre péptidos derivados de estas proteínas y el dominio PDZ de la nNOS hace que se estabilice ante la desnaturalización térmica y se desplace su  $T_m$ , en general entre 1 y 2 °C (Fig. 5.18). Se confirmó posteriormente por calorimetría que las afinidades de estas proteínas son extremadamente bajas, y pueden escaparse al rango de sensibilidad de las técnicas aplicadas. En concreto, los datos preliminares mediante ITC revelan que, de todos los péptidos probados en igualdad de condiciones (1 mM de péptido titulado sobre unos 70  $\mu$ M de PDZ recombinante), sólo las claudinas 3 y 14, junto a Nav1.4 y PMCA-4b han dado una interacción detectable. En el caso del receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico, se obtiene un termograma que podría indicar que hay una interacción positiva, pero de muy baja afinidad. Es posible que este sea el caso con las otras proteínas, por lo que el uso de mayores concentraciones de PDZ recombinante podría permitir su análisis.

La proteína PMCA-4b se ha descrito y comentado anteriormente [56] como ejemplo de secuencia de tipo I, pero las claudinas y el canal de sodio no han sido descritas. Éstas fueron identificadas en el análisis a gran escala realizado por [45], en un estudio en donde otras proteínas, también descritas y estudiadas en esta Tesis han dado una interacción negativa, como son la CtBP o PFK-M [45].



Curiosamente, las otras claudinas y proteínas cercanas a Nav1.4 tienen una secuencia similar entre sí, pero que no son capaces de dar una interacción positiva en este estudio. Salvo dos excepciones, las claudinas tienen en sus extremos C-terminales un residuo de Valina (Val<sub>0</sub>). La posición -2 está ocupada por varios tipos de residuos, pero destaca que tanto la claudina 3 como la 14 tienen un Asp<sub>-2</sub>. Otras claudinas también tienen un ácido en esta posición, pero pierden la interacción, probablemente por la identidad del aminoácido en P<sub>-3</sub>, viéndose que la presencia de un aminoácido básico (Arg o Lys) puede estar afectando negativamente en el entorno positivo del sitio de unión en el dominio PDZ. Del mismo modo, puede verse una combinación favorable en la claudina 16 (AKMYAVDT**RV**\*), pero que se ve contrarrestada con la presencia de la Arg<sub>-1</sub>.

Como se puede ver en la figura 5.20, las afinidades de estas proteínas entran en un rango micromolar, algo menor que el encontrado en NOS1AP. Sus perfiles termodinámicos indican que la interacción estaría dirigida entrópicamente, aunque este hecho es difícil de interpretar por la alta proporción de cargas positivas y negativas de estos péptidos. Nuevos estudios más detallados serán necesarios para confirmar este comportamiento y tratar de entender el mecanismo.

Las claudinas son proteínas implicadas en la adhesión celular, participan en las uniones estrechas para mantener la barrera que separa los compartimentos apical y basolateral, tanto a nivel extracelular como en la membrana plasmática. Se han descrito recientemente la interacción de claudinas con proteínas con dominios PDZ, como la claudina 1 y MUPP1 (a través de su PDZ10). La participación de la nNOS en las adhesiones celulares, mediada por su reclutamiento específico a estas estructuras podría ser un mecanismo implicado en muchas enfermedades derivadas del estrés oxidativo causado por •NO, por ejemplo en la barrera hematoencefálica tras una isquemia, donde las estructuras de tipo uniones estrechas son fundamentales [276]. De hecho, hay otros casos en los que las claudinas pueden reclutar proteínas con dominios PDZ a través de sus extremos C-terminales, como MUPP1 [63], y cuya afinidad de interacción cae en el mismo rango para la interacción claudina 1-MUPP1 [272].

Se iniciaron estudios de microscopía de fluorescencia para tratar de determinar esta implicación. En la figura 5.21 se muestran imágenes de epifluorescencia, y se ven en verde las estructuras periféricas, presumiblemente correspondiente a las uniones estrechas. Estos resultados preliminares no son concluyentes, porque la epifluorescencia no muestra únicamente un plano focal, por lo que no se puede discernir la localización intracelular en el eje apical. Estas imágenes preceden a los experimentos más precisos para analizar en el microscopio de fluorescencia confocal, en los que las células de riñón canino (Madin-Darby Canine Kidney, MDCK) serán transfectadas con estas construcciones fluorescentes para un análisis más fino.

Se han recopilado en la tabla 7.1 los resultados, muchos de ellos preliminares, de la interacción de los diferentes péptidos analizados con el dominio PDZ de la nNOS.

Como se ha comentado anteriormente, en el experimento del desplazamiento de la *T<sub>m</sub>* se está forzando a interacción con un desplazamiento del equilibrio hacia la formación del complejo por el uso de altas cantidades de los péptidos con respecto al dominio PDZ, por lo que, aunque sean



Proteína				Técnica					
Nombre	Tipo	-3	-2	YTH	Cell	$\Delta T_m$ (°C)	FP ( $K_d$ , $\mu$ M)	ITC ( $K_d$ , $\mu$ M)	RMN
Bredt	III	G	D	+++	++	$\approx +7$	$\approx 5^\dagger$	$\approx 2$	Tyr77
$\alpha$ Adr.	III	G	E	—	—	$\approx +1,5$	—	—	—
NOS1AP	II	E	I	++	$\downarrow +$	$\approx +4$	$\approx 100$	$\approx 7,5$	Ser44
R. Melat.	III	V	D	$-(\downarrow + 24 \text{ h})$	—	$\approx +2$	—	—	—
PFK-M	II	E	A	—	—	$\approx +3,8$	—	—	—
R. 2B Serot.	I	V	S	—	—	$\approx +2$	—	—	—
PMCA-4b	I	E	T	—	—	$\approx +2$	$\approx 200$	—	—
CtBP	III	S	D	—	—	$\approx +2,5$	—	—	—
NIDD	III	E	D	$-(\downarrow + 24 \text{ h})$	—	$\approx +2$	—	—	—
Cyt. C ox.	III	D	L	—	—	$\approx +3$	—	—	—
Vac14	II	R	V	—	—	$\approx +2$	—	—	—
T. Serot.	—	M	N	—	—	$\approx +3,6$	—	—	—
Nav1.4	I	E	S	—	—	$\approx +5$	—	$\approx 10$	—
Clau. 3	III	K	D	—	—	$\approx +6$	—	$\approx 25$	—
Clau. 14	III	N	D	—	—	$\approx +4$	—	$\approx 40$	—

**Tabla 7.1:** Recopilación de los datos obtenidos durante el análisis de los péptidos que teóricamente se introducen en el dominio PDZ de la nNOS. Puede verse que en los casos que se ha podido determinar, las afinidades son en general bajas.  $\dagger$  Este experimento fue realizado con la secuencia del péptido Bredt123.

de muy baja afinidad, están asociadas y mejoran la estabilidad del dominio PDZ. En general, las interacciones de secuencias C-terminales a los dominios PDZ suelen dar afinidades entre 0.1 y 50  $\mu$ M, estando el 90 % de ellos en menos de 50  $\mu$ M, el 60 % en menos de 20  $\mu$ M y los datos obtenidos en los experimentos realizados durante esta Tesis están en concordancia con ello. Harán falta un conjunto de nuevos experimentos complementarios para terminar de definir el perfil de los péptidos que puedan insertarse en el dominio PDZ de la nNOS. Una posibilidad es utilizar un ensayo de competición por calorimetría, en el que los péptidos de baja afinidad son desplazados por la adición de péptidos de alta afinidad, un método que permite obtener la  $K_d$  de una forma indirecta [277]. Se puede concluir que este dominio ha evolucionado para acoger una alta variabilidad de secuencias a costa de perder en su afinidad. Esto podría tener también sus consecuencias a nivel fisiológico, en cuanto a la proporción de nNOS que se encuentre con cada proteína.

## 7.1. Conclusiones

El dominio PDZ de la nNOS muestra un comportamiento mixto en cuanto al reconocimiento de secuencias C-terminales. A pesar de haberse identificado una secuencia consenso que es reconocida con alta afinidad, esta secuencia artificial no pertenece a ninguna proteína. Las proteínas reales, sin embargo, tienen secuencias que pueden ser muy diferentes a esta secuencia consenso, pero aún así son capaces de unirse al PDZ de la nNOS. con los estudios realizados en esta Tesis se han sentado las bases moleculares que dirigen la selectividad de estas secuencias tan variadas, gracias a la identificación de aminoácidos clave que participan en el reconocimiento de los residuos en las posiciones concretas de la secuencia. El aumento en la versatilidad del reconocimiento de estas secuencias ha sido posible a

cambio de la pérdida considerable de la afinidad, lo que permite a su vez un nuevo nivel de regulación, con la posible participación de otras regiones de la misma proteína o de proteínas externas. Se han analizado las secuencias C-terminales de péptidos reales, muchos de los cuales tienen una afinidad detectable, pero otros, o no se unen, o se unen con muy baja afinidad. Entre las secuencias de afinidad media, se ha confirmado la interacción de algunos ligandos que pueden tener relevancia fisiológica, como la ATPasa dependiente de calcio (*Plasma Membrane Calcium/calmodulin-dependent calcium ATPase*, PMCA-4b) o las claudinas 3 y 14.



## Capítulo 8

### DYNLT1 y las GTPasas

Las cadenas ligeras de las dineínas (DYNLT y DYNLL) son pequeñas proteínas que actúan como grapas, moléculas que participan en la dimerización y en la formación de complejos. Su papel mejor conocido es su participación en el motor de dineínas, donde se asocian a las cadenas intermedias, promueven su dimerización y dirigen el ensamblaje del complejo motor. DYNLL1 es la más estudiada de las LCs. Se han descrito más de 30 proteínas que interaccionan con DYNLL1 y se ha definido su secuencia consenso de unión con bastante exactitud [278], secuencias que caen en uno de los dos tipos identificados, -KSTQT- o -GIQVDR- [155]. Dado que las proteínas diana suelen ser proteínas dimericas, el papel principal de la interacción puede ser la regulación de la formación de estos complejos, con las cadenas ligeras como puntos de regulación, mediante fosforilación u otros estímulos celulares. Además de la componente secuencial, también hay una gran participación estructural en la formación de estos complejos, pues DYNLL1 se asocia en región intrínsecamente desordenada en las proteínas diana, un factor que contribuye a su especificidad.

Por el contrario, los trabajos relacionados con DYNLT1 son más escasos y aunque recientemente se han ido obteniendo datos muy interesantes sobre sus funciones, la información existente sobre esta proteína es exigua. Al igual que DYNLL1, DYNLT1 es una proteína dimerica, con la que comparte el patrón de estructura secundaria y el plegamiento en estructura terciaria. De manera semejante, al formarse el dímero también aparece el sitio de interacción, pero a diferencia de DYNLL1, no existe una forma monomérica de DYNLT1. Sin embargo, todavía no ha sido posible identificar una secuencia consenso para el reconocimiento de DYNLT1, pues el alineamiento de las proteínas que interaccionan con DYNLT1 no revela *a priori* ningún patrón común. Además, la falta de estructuras cristalográficas de esta proteína con diferentes ligandos también dificulta mucho la determinación de los mecanismos moleculares que puedan dirigir las interacciones. Es más, se ha visto la posibilidad de que este pequeño polipéptido pueda tener otra superficie de interacción además del sitio canónico, introduciendo más incertidumbre en su estudio [214].

En este sentido, la hipótesis inicial sobre la función de las cadenas ligeras era la de asociación de proteínas celulares al motor de dineína para su transporte retrógrado, dado que podían asociarse a las cadenas intermedias de las dineínas y a un número creciente de ligandos. Sin embargo, al verse

que tanto estas proteínas celulares como la cadena intermedia se asociaban en el mismo sitio, se fue desechando esta idea, tomando más fuerza la función de grapa de dimerización [135]. Pero con la posibilidad de que exista un segundo sitio de interacción en la superficie de DYNLT1, esta posible función de adaptador vuelve a cobrar fuerza.

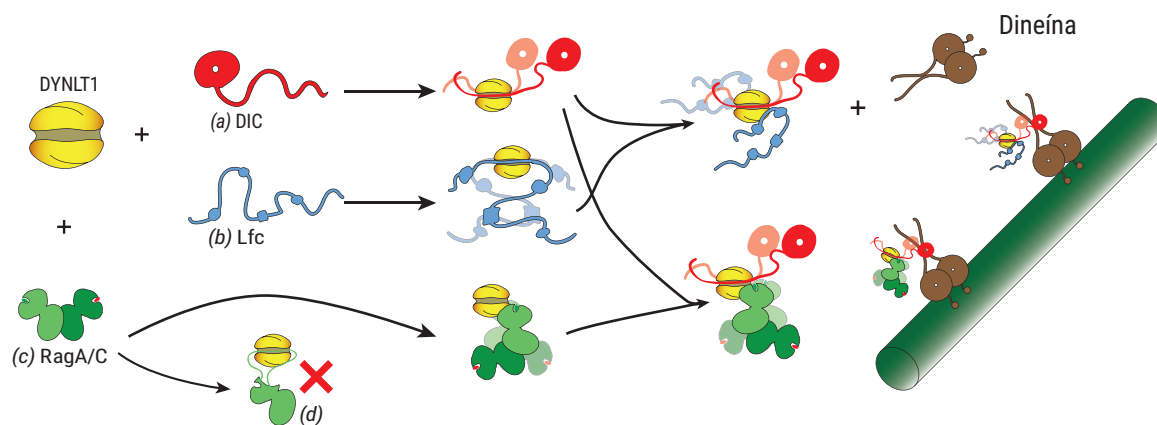
Las GTPasas son interruptores moleculares, que ciclan entre un estado activo (+ GTP) y un estado inactivo (+ GDP) y están reguladas por proteínas accesorias que promueven su actividad GTPasa intrínseca (por las GAP) y el intercambio del GDP gastado por un nuevo GTP (por las GEF) para volver a empezar el ciclo. La implicación de los motores moleculares en diversos aspectos de las GTPasas está bien descrita, y particularmente en el caso de las dineínas, las proteínas de la familia Rab participan en el reclutamiento del motor a diferentes compartimentos de membrana para su transporte y localización subcelular. En relación a las cadenas ligeras, se ha relacionado a DYNLT1 en la señalización por RhoGTPasas mediante su interacción a la factor de intercambio del nucleótido de guanina (*Guanosine Exchange Factor*, GEF) Lfc ( $\equiv$  GEF-H1) [214, 233], describiéndose y se describió un modelo en el que Lfc se mantenía inactivo y asociada al microtúbulo gracias a su interacción simultánea con DYNLT1 y la cadena intermedia, y por extensión, al motor de dineína y los microtúbulos.

Hace 15 años que se describió la interacción entre DYNLT1 y la GTPasa RagA ( $\equiv$  RRAGA, FIP1) [197], y recientemente se encontró que otra GTPasa, Rab3D, era también capaz de asociarse a DYNLT1 y de ser translocada por los microtúbulos [216]. En el caso de Rab3D, esta interacción está implicada en las rutas de reabsorción de hueso por los osteoclastos, ya que la disrupción del complejo Rab3D-DYNLT1 afecta profundamente a este proceso. Sin embargo, la asociación entre DYNLT1 y RagA fue descrita en el marco de la infección por adenovirus, pero no se profundizó en sus mecanismos ni funciones.

En esta Tesis se ha caracterizado la interacción entre las GTPasas RagA y Rab3D y la LC DYNLT1 mediante técnicas de biología celular y bioquímica, como dobles híbridos de levaduras, inmunoprecipitación y cosedimentación, microscopía confocal y resonancia magnética nuclear.

Primero se confirmó la interacción entre RagA y DYNLT1 por dobles híbridos de levadura y cosedimentación en células de mamífero. La secuencia identificada (RagA 52-67) pertenece a la región denominada *Switch II*, que son conocidas en las GTPasas por sufrir los cambios conformacionales dependientes del estado nucleotídico. Aunque no se tiene la estructura cristalográfica de la conformación inactiva de RagA (o de su homólogo Gtr1), se sabe que las GTPasas sufren grandes cambios conformacionales en la región *Switch II* según su estado de activación, por lo que no es descartable que la interacción entre esta secuencia y DYNLT1 sea dependiente de la conformación, es decir, del estado de ocupación del nucleótido.

Habiéndose analizado la interacción entre RagA y DYNLT1 con técnicas de biología celular, ante la posibilidad de que la asociación fuese por una región superficial de DYNLT1 y que esto podría permitir la formación de un complejo ternario entre DIC:DYNLT1:RagA, se procedió a tratar de demostrarlo. Para ello se creó una construcción quimérica, en la que se fusionó al extremo C-terminal de DYNLT1 la secuencia canónica de unión a DIC, con la que se espera que ocupe su propio canal



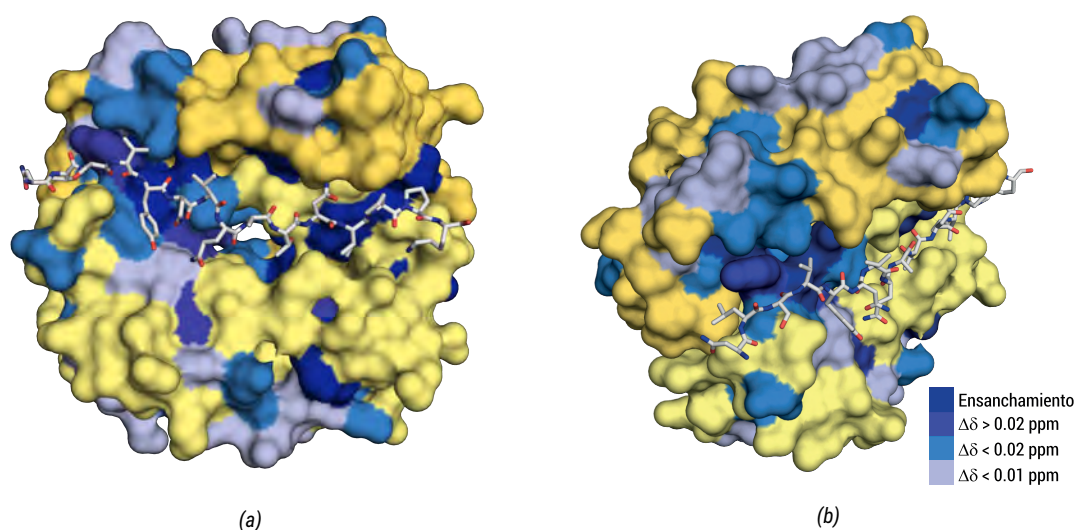
**Figura 8.1:** Posibles modos de interacción de DYNLT1. (a) DYNLT1 se asocia a la cadena intermedia mediante la inserción de dos secuencias de estructura desordenada. (b) Se ha descrito que la interacción de Lfc puede ser de dos tipos, uno ocupando el mismo sitio que la DIC cuando ésta no está; o estar asociada de una forma superficial en el complejo ternario que serviría para mantener a Lfc secuestrada en los microtúbulos e inactiva [214]. (c) La interacción con RagA parece estar mediada sólo por esta segunda superficie con una función aún sin determinar. (d) Se descarta la posibilidad del desplegamiento de la estructura de RagA para insertar la región extendida.

después de la traducción, y se denominó DYNLT-IC a esta forma autosaturada. Se comprobó la validez de este modelo en dobles híbridos de levadura (Fig. 6.14) y en experimentos de cosedimentación (Fig. 6.15a), así como su localización diferenciada en microscopía confocal (Fig. 6.13). En todos ellos se vio que la DIC era incapaz de unirse a la forma autosaturada de DYNLT1. Destaca en la localización celular que DYNLT-IC, a diferencia de DYNLT1, no mostraba una localización intranuclear, lo que indica que el canal de interacción donde se inserta la DIC podría ser utilizado por otras proteínas aun sin identificar que dirigirían la importación de DYNLT1 al núcleo. Sin embargo, esta DYNLT-IC sí que interactuó con las GTPasas. Como se vio en el ensayo de dobles híbridos de levadura (Fig. 6.14) y en células de mamífero (Fig. 6.16) tanto a RagA completa como el segmento RagA(52-67) así como Rab3D, interactuaron con la forma autosaturada DYNLT-IC, lo que demuestra que pueden formar un complejo triple con DYNLT1 y con la DIC.

Antecedentes de una asociación superficial y la formación de un complejo triple se encuentran en la interacción descrita recientemente por el grupo del Dr. R. Rottapel, y sus estudios con Lfc. Ellos demostraron que un mecanismo de regulación de la actividad de Lfc era su localización a los microtúbulos de una forma dependiente de las dineínas, gracias a la formación de un complejo ternario DIC:DYNLT1:Lfc [214], y desarrollaron a su vez un modelo muy interesante para su activación en respuesta a la señalización por GPCR [233], implicando a otro ligando conocido de DYNLT1, el dímero  $\beta\gamma$  del GPCR ( $G_{\beta\gamma}$ ) [211]. Sin embargo, en este caso la secuencia de Lfc identificada por ellos se encuentra en una zona intrínsecamente desordenada, lo que permite un modo doble de asociación compitiendo con la DIC por la ocupación del canal de la interfase de DYNLT1.

Las funciones celulares de esta interacción no están claras. En el caso de Lfc, la asociación a DYNLT1 implica su retención en los microtúbulos, mantenida en un estado inactivo. Mediante la despolimerización de los microtúbulos [214] o en respuesta a estímulos externos (como la trombina,

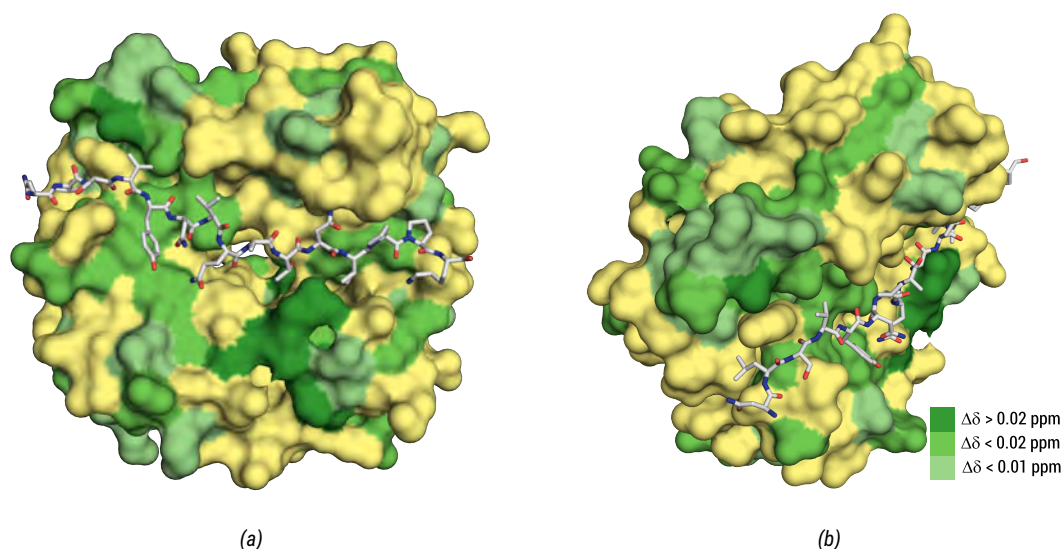
a través de su GPCR [233]) se produce la separación de este complejo, y conduce a la activación local de GEF sobre la GTPasa RhoA. RagA es una GTPasa que está implicada en la respuesta celular a los nutrientes, y es la conexión entre la abundancia de aminoácidos y la biogénesis de orgánulos de degradación [279]. Es la única GTPasa conocida que es dimérica, en las que RagA o B ( $\equiv$  Gtr1) forman un heterodímero con RagC o D ( $\equiv$  Gtr2). RagA está activa si tiene el nucleótido GTP unido, y su nivel de activación está modulado por el estado nucleotídico de su compañero. Así, la máxima actividad la tiene RagA/B<sup>GTP</sup>/RagC/D<sup>GDP</sup> [280], y en este estado es reclutada a la membrana del lisosoma para participar en la señalización mediada por los complejos mTORC [281]. Se comprobó si el estado de activación de RagA era determinante para la interacción con DYNLT1 mediante la incubación de los extractos celulares con condiciones que podrían alterarlo. El EDTA es un agente quelante que eliminaría del medio los iones divalentes. La retirada de los iones de Mg<sup>2+</sup> evita la unión del GTP al sitio activo de la enzima, y esta pasaría a quedarse en una conformación inactiva. Del mismo modo, se utilizó el nucleótido GPPNP, un análogo del GTP que tiene un enlace fosfoimido en lugar del fosfoéster, por lo que no es hidrolizable por la GTPasa y ésta se queda en una conformación activa. En estas condiciones, no se detectó ninguna diferencia en cuanto a la interacción con DYNLT1 (Fig. 6.12), ni con RagA ni con Rab3D, lo cual es de esperar si se tiene en cuenta que la interacción puede darse con un péptido corto, independiente de la estructura de la proteína.



**Figura 8.2:** Perturbaciones de DYNLT1 tras la interacción con el péptido de DIC. Se ha representado sobre la estructura cristalográfica de *D. melanogaster* los cambios en los desplazamientos químicos de DYNLT1 tras la adición del péptido de DIC, y puede verse que en su mayoría corresponden al surco de interacción canónico. Se representa la cadena intermedia del cristal como guía. PDB ID: 3FM7.

El siguiente paso consistió en utilizar la espectroscopía RMN para mapear la interacción de RagA sobre la superficie de DYNLT1. Con la colaboración del grupo de la Dra. M. Bruix, se obtuvo la asignación de las señales HSQC de la proteína DYNLT1 expresada recombinantemente y marcada con <sup>15</sup>N (Fig. 6.17). Con más del 90 % de los aminoácidos identificados se titularon los péptidos de DIC y RagA y se determinaron los cambios de los desplazamientos químicos de DYNLT1 inducidos por

la interacción con estos péptidos (Fig. 6.18a). Una forma de presentarlos son los histogramas de perturbaciones de los desplazamientos químicos, alineados con los elementos de estructura secundaria (Fig. 6.18c), y otra es la proyección de estos cambios sobre la estructura tridimensional. En este caso, la proteína DYNLT1 utilizada en los experimentos de RMN es una forma procedente de *H. sapiens*, de la cual no hay ninguna estructura depositada aún. En las figuras 8.2 y 8.3 se han representado los cambios de los desplazamientos químicos obtenidos en la isoforma de *H. sapiens* sobre la estructura de *D. melanogaster*. Se puede ver a partir de los cambios en los desplazamientos químicos que la

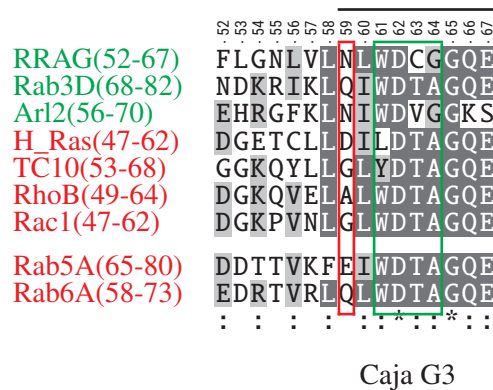


**Figura 8.3:** Perturbaciones de DYNLT1 tras la interacción con el péptido de RagA. Se ha representado sobre la estructura cristalográfica de *D. melanogaster* los cambios en los desplazamientos químicos de DYNLT1 tras la adición del péptido de la GTPasa. Aunque algunos coinciden en el surco de la interfase, la mayoría se distribuyen por la zona superficial del extremo N-terminal. Se representa la cadena intermedia del cristal como guía. PDB ID: 3FM7.

interacción de DIC y RagA a DYNLT1 es diferente (Fig. 6.18c). Como era de esperar, en el caso de la cadena intermedia se ven modificados la mayoría de los aminoácidos de la cadena  $\beta 3$ , que es la que recibe directamente el péptido, y los aminoácidos cercanos implicados en una interacción canónica (Fig. 8.2, azul). Sin embargo, los residuos alterados por RagA son más numerosos, y destacan las perturbaciones en el extremo N-terminal de DYNLT1 (Fig. 8.3), además de los residuos de las cadenas  $\beta 2$  y 3. En la estructura depositada, los aminoácidos correspondientes al extremo N-terminal no han sido incluidos, por lo que no se puede saber a ciencia cierta cual es la conformación que adoptan. Estudios estructurales por RMN realizados durante esta Tesis indican por medio de experimentos NOE que estos aminoácidos están en conformaciones desestructuradas, lo que concuerda con la ausencia de los mapas electrónicos de las estructuras cristalográficas depositadas (no mostrado). Este extremo flexible podría favorecer la unión aumentando la superficie de interacción entre ambas proteínas.

La caracterización de la interacción de una de RagA que es muy conservada entre la familia





**Figura 8.4:** GTPasas seleccionadas en la región entorno a la caja G3. Se representa la región circundante de la caja G3 de las GTPasas que se analizaron, cuya secuencia fue fusionada en el extremo C-terminal de la GFP para los experimentos de cosedimentación. La numeración corresponde a la proteína RagA. Se indican de color verde las secuencias que dieron una interacción positiva en células, y en rojo las que no (Fig. 8.4). Se han añadido además aquellas GTPasas que en el mismo trabajo de Pavlos et al. [216] describieron la ausencia de interacción. Se recuadra en verde la caja G, y en rojo una posición determinante.

de las GTPasas abre la posibilidad de que otras proteínas GTPasas puedan también interactuar con DYNLT1. Esta posibilidad se exploró con experimentos de cosedimentación, en los que varias GTPasas fueron seleccionadas. Algunas de ellas fueron analizadas en su versión completa, mientras que con otras se clonó un segmento equivalente al de RagA(52-67). En la figura 6.19 se muestran las GTPasas que interactuaron con DYNLT1. Además de Rab3D y RagA, sólo la GTPasa Arl2 fue capaz de ser cosedimentada por DYNLT1.

Al analizar sus secuencias, que se recopilan en la figura 8.4, junto con las proteínas estudiadas en este experimento muestran un alto grado de identidad en los alrededores, sin embargo esas pequeñas diferencias parecen suficientes para permitir o no la interacción con DYNLT1 en un ambiente celular. En las secuencias estudiadas, la mayor diferencia que se detecta entre las que interactúan y las que no es la posición 59 (en RagA), en la que el grupo amida de Gln o Asn no está presente en el resto de las secuencias, pero es posible que otros determinantes puedan estar implicados. Nuevos estudios mutacionales o la titulación de DYNLT1 sin marcar sobre péptidos marcados con  $^{15}\text{N}$  podrían ayudar a perfilar los residuos importantes en la interacción.

En estos casos se utilizó tanto la proteína completa como la secuencia identificada originalmente (Rab3D 74-95 [216]) (Fig. 8.4) lo que añade un dato extra: se puede acotar aún más la secuencia de interacción, ya que todas estas secuencias son homólogas entre sí. La secuencia que es común a Rab3D y RagA corresponde a las posiciones 59 a 68, y se podrían realizar nuevos experimentos con las secuencias más cortas para confirmar esta observación.

## 8.1. Conclusiones

Los experimentos desarrollados durante esta parte de la Tesis aportan datos valiosos e interesantes para definir un posible punto de regulación adicional a la biología de las GTPasas, como es su reclutamiento al motor de las dineínas para controlar su localización subcelular, regular su disponibilidad o restringir su actividad.

Se ha demostrado una interacción directa entre las GTPasas RagA y Rab3D por diversas técnicas bioquímicas y de biología celular. Más aún, se ha acotado la región mínima necesaria para dirigir esta interacción, a un segmento de unos 10 aminoácidos alrededor de la caja G3. Esta interacción es independiente del motor de dineína pero puede ser simultánea, pues se ha demostrado la formación de un complejo triple entre la GTPasa RagA, la cadena ligera DYNLT1 y la cadena intermedia DIC. En esta línea, se ha identificado una superficie de interacción en DYNLT1 diferente al lugar de inserción de la hebra extendida de la DIC que permite la asociación simultánea de estas dos proteínas a DYNLT1.



## **Parte IV**

### **Metodología experimental**



# Capítulo 9

## Materiales

### 9.1. Reactivos generales

La mayoría de los reactivos comunes utilizados (sales, tampones, etc) fueron proporcionados por Sigma-Aldrich y Merck. Los reactivos particulares fueron adquiridos según se describe a continuación. Los reactivos de clonación, las enzimas de restricción, las polimerasas Taq y Pfu y la ligasa del fago T4 son de Fermentas y, posteriormente, Thermo Scientific, así como los marcadores de masa molecular para electroforesis de proteínas o ADN. Los reactivos de cultivos celulares como la glutamina y los antibióticos penicilina y estreptomycin son de Sigma. El suero bovino fetal (FBS), y la tripsina son de BioWittaker, mientras que el reactivo de transfección Turbofect es de Thermo Scientific. Las resinas utilizadas en las columnas de cromatografía fueron Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals) y níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA) (Agarose Beads Technologies). El imidazol es de Sigma, el 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) es de Fluka, y los aminoácidos puros son de Merck. El dimetilsulfóxido (DMSO) es de Fluka. Como inhibidores de proteasas se utilizó la aprotinina (Roche), la leupeptina (Bachem), y el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma). Como agentes reductores, se utilizó 2-mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) (Merck), ditioneitol (DTT) y tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP) (Sigma). El paraformaldehído (PFA) y la dimetil formamida (DMF) son de Sigma, así como el medio de montaje Fluoroshield™ (con DAPI). Los detergentes utilizados en diversos experimentos fueron el dodecil-sulfato sódico (SDS) (Merck), ácido deoxicólico (Sigma), Tween®-20 de Panreac, Triton®X-100, y DECON®-90 (Decon Labs).

### 9.2. Células y cepas

Para la clonación y amplificación de los plásmidos, y producción recombinante de las proteínas, se utilizaron dos cepas de *Escherichia coli*, competentes por el método del cloruro de rubidio:

- La cepa DH5 $\alpha$  F fue utilizada como herramienta para la construcción y amplificación de los plásmidos y se caracteriza por su genotipo: F $\phi$ endA1 hsdR17 (r-k,m+k) supE441- thi-1 recA1

Gen ( <i>Alelo</i> )	Fenotipo
TRP1 (901)	Trp <sup>-</sup> , no puede sintetizar triptófano, complementado con el pGBT9.
LEU2 (2-3, 112)	Leu <sup>-</sup> , no puede sintetizar leucina, complementado con el pGAD.
HIS3 (200)	His <sup>-</sup> , no puede sintetizar histidina, complementado con una interacción positiva entre las proteínas de estudio.
LYS2 (801)	Lys <sup>-</sup> , suplementado en el medio.
ADE2 (101)	Ade <sup>-</sup> , suplementado en el medio. Produce una coloración rosa cuando escasea la adenina.
URA3 (52)	Ura <sup>-</sup> , suplementado en el medio.
CYH2 ( <i>resistente</i> )	Cyh <sup>r</sup> , resistente a la cicloheximida.
GAL4 ( $\Delta$ 4, 542)	Gal4 <sup>-</sup> , no expresa este factor de transcripción, el cual se reconstruye con una interacción positiva entre las proteínas de interés.

**Tabla 9.1:** Características genotípicas y fenotípicas de las levaduras de la cepa Y190 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en los ensayos de dobles híbridos de levaduras.

gyrA (NaIr) relA1  $\Delta$ (lacIZYA-argF) U169 deoR  $\phi$ 80 dlac  $\Delta$ (lacZ) M15.

- Las bacterias BL21(DE3) fueron utilizadas para la producción de proteínas recombinantes. Su genotipo es adecuado para dicha función: Ft'-ompT[lon]hsdSB(r-b,m-b) gal[dcM] y el profago 1 que contiene el gen de la RNA polimerasa del fago T7 y el lisógeno del fago  $\lambda$  DE3 (T7 RNA polimerasa).

Para los experimentos de dobles híbridos se utilizó el sistema Matchmaker de Clontech, basado en el factor de transcripción GAL4, utilizándose la cepa Y190 de *Saccharomyces cerevisiae*, una cepa auxótrofa para la síntesis de los aminoácidos triptófano, leucina, lisina e histidina, así como de los nucleótidos adenina y uracilo. Sus características fenotípicas se recopilan en la tabla 9.1.

Los experimentos realizados en células de mamíferos, como inmunoprecipitación, cosedimentación, expresión recombinante y marcajes fluorescentes para microscopía confocal fueron realizados en líneas celulares establecidas descritas a continuación.

**Las células COS7** (células de riñón de mono verde africano, *Chlorocebus aethiops*) fueron un regalo del Dr. M. A. Alonso (Centro de Biología Molecular (CBM), Madrid).

**Las células HEK293** (*Human Embryonic Kidney*) fueron proporcionadas por la Dra. Teresa Iglesias (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols).

**Las células MDCK** (*Madin-Darby Canine Kidney*) células epiteliales de riñón de *C. familiaris* también fueron cedidas por el Dr. M. A. Alonso.

### 9.3. Medios de Cultivo

Para el cultivo de las células de mamíferos se utilizó medio DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) de Sigma suplementado con suero FBS (previamente descomplementado a 56 °C durante una hora) al 10 % (v/v), con 100 unidades/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina y con 2

mM de glutamina, medio denominado completo. Para la transfección, se utiliza medio DMEM ( con FBS al 5 %, y las mismas proporciones de antibióticos y glutamina.

Durante la clonación y amplificación de los plásmidos, las bacterias son cultivadas en caldo para lisogenia (*Lysogeny Broth*, LB), que contiene triptona al 1 % (p/v), extracto de levadura al 0.5 % (p/v) y 10 g/l cloruro sódico, suplementado con el antibiótico de selección adecuado.

Para la producción recombinante de proteínas se utilizó medio rico 2xYT (triptona 1.6 % (p/v), extracto de levadura 1 % (p/v) y 5 g/l de cloruro sódico ) con el antibiótico adecuado. Para los experimentos de resonancia magnética nuclear, las bacterias deben ser crecidas en medio mínimo M9 (45 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 22 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.6 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ ), añadiendo si es necesario 18.7 mM  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  o  $^{13}\text{C}$ -glucosa al 0.2 % (p/v), ambos de Cambridge Isotope Laboratories.

Para la transformación de levaduras, se crecen en medio rico extracto de levadura, peptona, dextrosa y adenina (*Yeast extract, peptone, dextrose and adenine*, YPDA) (extracto de levadura 1 %, peptona 2 %, glucosa 2 %, sulfato de adenina). Durante el desarrollo experimental del doble híbrido, se utilizan medios mínimos selectivos SDAK (base de nitrógeno para levaduras (*Yeast Nitrogen Base*, YNB) sin aminoácidos al 0.67 %, glucosa al 2 %, y agar al 2 % para medio sólido), suplementado con lisina, uracilo y adenina. Los transformantes simples deben llevar, además, leucina o triptófano, y la selección de los transformantes dobles se realiza con la adición de histidina o 3AT.

## 9.4. Tampones y soluciones de stock

**TBS:** Tampón salino de Tris, utilizado como tampón estándar en la mayoría de los experimentos: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7-8.

**HBS:** 20 mM ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazin] etanosulfónico (HEPES), 150 mM NaCl, pH 7-8. Es apropiado para los experimentos de calorimetría por el bajo nivel de ionización del HEPES en agua.

**NF:** (Del húngaro *Native Félrtaró*, lisis nativa) 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 300 mM NaCl, 3 mM  $\text{N}_3\text{Na}$ .

**PBS:** Tampón salino a base de fosfato, NaCl 137 mM, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4.

**RIPA:** De *Radioimmunoprecipitation Assay*, 50 mM Tris-HCl y pH 7.35; 150 mM NaCl, Triton X-100 al 1 % (v/v), ácido deoxicólico al 0.1 % (p/v) y SDS al 0.1 % (p/v).

**Z:** Tampón para el revelado del ensayo del X-Gal. Contiene  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  para una concentración de fosfato de 100 mM, y pH 7; 10 mM KCl y 10 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

### 9.4.1. Soluciones de stock

Algunos reactivos son disueltos a alta concentración en una solución de almacenamiento, a partir de la cual son añadidos a las soluciones de trabajo a la dilución indicada.

**Ampicilina:** 100 mg/ml en agua, 1000x.



**Kanamicina:** 50 mg/ml en agua, 1000x.

**Leupeptina:** 4.75 mg/ml (10 mM) en agua, 1000x.

**Aprotinina:** 1 mg/ml (0.153 mM) en tampón salino de fosfato (*Phosphate Buffered Saline*, PBS), 1000x.

**PMSF:** 74 mg/ml (200 mM) en isopropanol, 1000x.

## 9.5. Anticuerpos

Todos los anticuerpos comerciales fueron obtenidos de Sigma-Aldrich o de Santa Cruz Biotechnology, según se indican en la tabla 9.2. Los anticuerpos secundarios marcados con un fluoróforo para microscopía confocal son de GE Healthcare. Los anticuerpos propios fueron sueros extraídos de conejos inmunizados con las respectivas proteínas recombinantes, generados por el grupo del Dr. Fernando Vivanco en la Fundación Jimenez Díaz. Todos los anticuerpos fueron titulados y caracterizados para confirmar su especificidad y diluciones de trabajo.

##	Epítipo	Origen	Comercial (ID)
1.	DIC(1-74)	Rabbit	Propio (Suero 176)
2.	GFP-50 ( <i>fl</i> )	Rabbit	Propio (Suero 50)
3.	GFP(3-17)	Mouse	Sigma (G6795)
4.	Lectin-Tctex1 <i>fl</i>	Rabbit	Propio (Suero 180)
5.	Tctex1 <i>fl</i>	Mouse	Sigma (D9944)
6.	Tctex1 <i>fl</i>	Rabbit	Santa Cruz (sc28537)
7.	$\alpha$ -Tubulina	Rabbit	Santa Cruz (sc5546)
8.	$\beta$ -Tubulina	Rabbit	Santa Cruz (sc5546)
9.	FLAG®-tag	Mouse	Sigma (F3165)
10.	$\alpha$ -Rabbit	Goat	Sigma (A9044)
11.	$\alpha$ -Rabbit	Goat	Novex (A16104)
12.	Cy2- $\alpha$ -Rabbit	Goat	GE Healthcare (PA42004)
13.	AlexaFluor® $\alpha$ -Mouse	Rabbit	Molecular Probes (A11062)

**Tabla 9.2:** Anticuerpos para la detección específica de proteínas en *western blot* y microscopía de fluorescencia.

En los experimentos de inmunoprecipitación se utilizó la sefarosa unida a la proteína A de *Staphylococcus aureus*, adquirida de Sigma.

## 9.6. Plásmidos

Todos los plásmidos utilizados son plásmidos lanzadera, que además de los elementos propios de su función, contienen un origen de replicación y un marcador de resistencia a antibióticos para su amplificación en bacterias.

**Plásmido de subclonación pGEMT:** Plásmido utilizado en algunos casos para la inserción de fragmentos amplificados por PCR con la polimerasa Taq. La polimerasa Taq inserta una adenina en el extremo 3' de la cadena elongada, la cual es compatible con una T desapareada presente en el plásmido

pGEMT, que viene linealizado de fábrica, y tras la ligación, se obtiene un plásmido circular covalentemente cerrado en el que el inserto interrumpe la traducción de la  $\beta$ -galactosidasa. La transformación de bacterias y su crecimiento en placas de LB-agar, en presencia de X-Gal produce colonias de color azul para las inserciones negativas y de color blanco para las positivas, permitiendo hacer una discriminación rápida de las colonias con un simple vistazo.

### 9.6.1. Plásmidos para expresión recombinante

Para los experimentos *in vitro*, se realizaron una serie de construcciones en diversos vectores de expresión recombinante que permiten su producción en sistemas bacterianos.

**Plásmidos del sistema pET:** El sistema pET de expresión recombinante se basa en el uso de la polimerasa de ARN del fago T7, inserto en el cromosoma de la bacteria para dirigir la maquinaria celular de expresión a la síntesis de la proteína de interés. Existen numerosos tipos, de los cuales algunos se utilizaron como sistemas de expresión o como plásmidos iniciales para obtener las modificaciones adecuadas.

**Plásmido pKLSLt:** El plásmido pKLSLt fue un generoso regalo del equipo del Dr. J. M. Mancheño [282]. Es un vector derivado del pET28, en el que se ha insertado, bajo el control del promotor, una lectina procedente del hongo *Laetiporus sulphureus*, seguido de una secuencia de corte para la proteasa del TEV, (-ENLYFQG-). En dicha secuencia se incluye en fase el sitio de corte de la enzima *EcoRI* para la clonación de los diversos insertos. Todas las construcciones en el plásmido pKLSLt están insertados entre los sitios *EcoRI* y *XhoI*, y confiere resistencia a la kanamicina.

**Plásmido pBH4:** El plásmido pBH4 fue un obsequio del grupo del Dr. László Nyitray. Es un derivado del pET19 y tiene un cassette que permite la expresión de la proteína de interés a continuación y en fase de un tag de 6xHis seguido de una secuencia de corte de la proteasa de TEV (-MGHHHHHDYDIPTTQSENLYFQG-). Todos los insertos clonados están flanqueados con los sitios de restricción *BamHI* y *XhoI*. Contiene el marcador de resistencia a la ampicilina.

### 9.6.2. Plásmidos para expresión celular

Para los experimentos en células, se utilizaron plásmidos de expresión transitoria, cuyo máximo de expresión se alcanza entre 24 y 48 horas después de la transfección. En todos los casos, los plásmidos proporcionan a la bacteria que los amplifica la resistencia al antibiótico kanamicina.

**pEGFP:** De Clontech, fusiona la proteína de interés en el extremo C-terminal de GFP (Ex=488 nm, Em=509 nm).

**pmCherry:** De Clontech, inserta a continuación de la proteína mCherry (Ex=587 nm, Em=610 nm).

**p3xFlag:** Patentado por Sigma, contiene el epítipo 3xFLAG® (-DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK-) para potenciar la detección de la proteína de fusión en *immunoblot*, y está conectado con la proteína de fusión por la secuencia de corte de la enteropeptidasa (subrayado).

### 9.6.3. Plásmidos para dobles híbridos de levaduras

En los experimentos de dobles híbridos, las levaduras son transformadas con dos plásmidos que codifican las proteínas de interés y los marcadores de selección. Se utilizaron los plásmidos del sistema Matchmaker® de Clontech.

**pGBT9:** Contiene el dominio de unión al ADN del factor de transcripción GAL4 (1-147) bajo el control del promotor constitutivo de la aldehído deshidrogenasa (*ADHI*), además del marcador de selección nutricional *TRP1*, que complementa la auxotrofía al triptófano de las levaduras. Confiere resistencia a ampicilina para su amplificación en bacterias.

**pAS2:** Es un plásmido derivado del pGBT9 que comparte todas sus características, e incluye en fase un epítipo de hemaglutinina (HA). También permite su selección en bacterias por ampicilina.

**pAS404:** Es un plásmido quimérico que contiene el dominio de unión al ADN a continuación de un epítipo HA, y bajo el control del promotor *ADHI*, con el gen *TRP1* y resistencia a la ampicilina en bacterias.

**pGAD-GH:** Contiene el dominio de activación de la transcripción del factor de transcripción de GAL4 (768-881), bajo el control del promotor *ADHI*. Incluye el marcador de selección nutricional *LEU2*, que complementa la auxotrofía a la leucina, y otorga resistencia a la ampicilina en bacterias.

## 9.7. Péptidos sintéticos

Los experimentos de interacción *in vitro* se realizaron con péptidos sintéticos, construidos por síntesis en fase sólida en sentido Ct → Nt por Thermo Scientific. Se resumen en la tabla 9.3 los péptidos utilizado y sus características.

Alternativamente, en los experimentos de polarización de fluorescencia se utilizaron una serie de péptidos sintéticos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) ( Ex = 492 nm; Em = 518 nm), adquiridos de Thermo Scientific.

##	Péptido	n	Mw (g/mol)	Pureza ( %)	Secuencia
1.	DIC	14	1575.6	84.817	-GVSKVTQVDFLPRE*
2.	RRAG	17	1956.0	71.42	-NLVLNLWDCGGQDTFME*
3.	Lfc (137-154) <sup>1</sup>	18	1864.4	92.42	-SRRGLSSLAKSVSTTN*
4.	Lfc (131-154)	24	2562.4	85.1	-RQSLGSRGRSSLAKSVSTTN*
5.	Lfc(131-161)	31	3316.7	99.369	-RQSLGSRGRSSLAKSVSTTNIAGHFND*
6.	Desmogleína				
7.	NOS1AP (12)	12	1276.1	92.7	-ELGSLDDEIAV*
8.	NOS1AP (8)	8	861.5	98.77	-SLDDEIAV*
9.	NOS1AP (6)	6	661.3	98.94	-DDEIAV*
10.	BREDT44 (11)	12	1358.5	95.225	-RLNLSYYGDAV*
11.	BREDT44 (4)	6	475.2	86.8	-GGGDAV*
12.	fosfofructokinasa	8	812.7	93.4	-KRSGEAAV*
13.	R. $\alpha$ -Adrenérgico	8	846.4	70.59	-LGENGEEV*
14.	NIDD/DHHC23	8	881.0	94.34	-HTPAEDIV*
15.	CtBP	8	985.3	97.392	-RDHTTDQL*
16.	T. Serotonina	8	875.3	97.94	-GDIRMNAV*
17.	R. 2B Serotonina	9	1066.1	96.53	-KAEEQVSYI*
18.	Cyt.C	10	1100.53	73.08	-TPEELGLDKV*
19.	Melatonin Recetor	9	1001.16	82.86	-NNLIVDSV*
20.	Vac14	11	1335.56	82.73	-RGDHLDRRVVL*
21.	PMCA-1b	10	1050.28	70.18	-SSLQSLETSV*
22.	Nav1.4	9	984.17	79.95	-RPGVKESLV*
23.	Claudin (3)	10	1187.9	98.734	-GTAYDRKDYV*
24.	Claudin (14)	10	1223.3	100	-HSGYRLNDYV*

**Tabla 9.3:** Péptidos sintéticos utilizados en los experimentos de ITC, CD y RMN.

##	Péptido	n	Mw (g/mol)	Secuencia
1.	BREDT123(f)	12	1766.6	<i>f</i> -DRLRNRVHGDAV*
2.	CAPON(f)	10	1391.38	<i>f</i> -GDSLDDEIAV*
3.	PCMA-1b(f)	10	1408.45	<i>f</i> -SSLQSLETSV*

**Tabla 9.4:** Péptidos sintéticos marcados con la sonda fluorescente FITC en el extremo N-terminal del péptido.



# Capítulo 10

## Métodos

### 10.1. Genética molecular

Todas las proteínas estudiadas fueron clonadas en diferentes plásmidos para los diversos tipos de experimentos. Para ello, se han seguido varias estrategias, fundamentalmente la amplificación de las secuencias de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) estándar y el diseño de oligonucleótidos que codifican un fragmento corto de la proteína. Las mutaciones puntuales se realizaron por el método *Quikchange*, en el que dos oligonucleótidos solapantes en sentidos opuestos, con la mutación a insertar, son utilizados para amplificar mediante PCR el plásmido completo. En todas las ligaciones se utilizó la ligasa del fago T4 (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. En algunas construcciones, se realizó la ligación de dos extremos de restricción procedentes de la digestión de enzimas diferentes, extremos que, aunque compatibles entre sí, no regeneran ningún sitio y se pierde la diana de restricción. Como ejemplos de enzimas que generan extremos compatibles están *XhoI* con *SalI*, *EcoRI* con *MfeI*, o *BamHI* con *BglII*. Todas las construcciones fueron confirmadas por secuenciación en el centro de apoyo a la investigación (CAI) de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

#### 10.1.1. Diseño del pEGFPmod

Con la idea de obtener proteínas de mamíferos expresadas en células de mamíferos, más afines a su ambiente natural, y tratar de minimizar los problemas relacionados con la necesidad de ciertas modificaciones post-traduccionales, se diseñó un plásmido de expresión que incluye el *tag* de lectina para la obtención a baja escala de proteína recombinante a partir de cultivos celulares.

Se tomaron como punto de partida los plásmidos pEGFP de Clontech y pKLSLt del Dr. Manchego. El pKLSLt es un plásmido derivado del pET28 [282]. El plásmido resultante contiene el *cassette* Lectina-GFP entre los sitios *XbaI*, justo a continuación del promotor T7 y el operador Lac, y *NotI* al final del sitio de clonación múltiple (*MultiCloning Site*, MCS), incluyendo un sitio de unión del ribosoma (*Ribosome Binding Site*, RBS). Por otro lado, el plásmido pEGFP contiene el *cassette* GFP-

MCS entre los sitios *NheI* y *NotI*, y justo a continuación de un promotor de citomegalovirus (CMV) y de la secuencia de Kozak, para la expresión en mamíferos.

Como *NheI* y *XbaI* son compatibles, una digestión con las enzimas indicadas y una ligación directa permitió crear un plásmido para expresión en mamíferos con el *tag* de lectina.

### 10.1.2. Clonación de fragmentos cortos de las proteínas

En los experimentos para mapear regiones de interacción y para minimizar las secuencias de las proteínas estudiadas, se diseña la clonación de estas secuencias mediante la hibridación de oligonucleótidos complementarios, que dejan extremos cohesivos con los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI*, para su inserción en los plásmidos linealizados con estas enzimas.

Todos los oligonucleótidos fueron encargados a Sigma Aldrich. Después de ser hidratados a 100  $\mu$ M, según las indicaciones del fabricante, se mezclan los oligonucleótidos a una concentración de 2.5  $\mu$ M cada uno, se hierven a 100 °C durante 10 minutos y se incuban a temperatura ambiente para maximizar la especificidad. A continuación, el dúplex hibridado se puede añadir a la mezcla de ligación con los plásmidos de interés linealizados. Los dúplex utilizados se recogen en la tabla 10.1.

##	Fragmento	Longitud	Secuencia
1.	DYNC1I1 (132-144)	13	EF-GVSKVTQVDFLPR*
2.	DYNC1I2 (108-128)	21	EF-GPIKLGMAKITQVDFPPREIV*
3.	Rab3D (74-95)	21	EF-QIWDTAGQERYRTITTAYYRGA*
4.	Rab3D (74-85)	11	EF-QIWDTAGQERYR*
5.	Rab3D (83-95)	12	EF-TITTAYYRGA*
6.	RagA <sup>†</sup> (65-82)	17	EF-LGNLVLNLWDCGGQD*
7.	Rac1 (48-61)	14	EF-KPVNLGLWDTAGQE*
8.	Arl12 (58-71)	14	EF-RGFKLNIWDVGGQK*
9.	BREDT44	13	EF-ARLNLSSYYGDAV*
10.	BREDT123	12	EF-DRLRNRVHGDAV*
11.	BREDT161	10	EF-IGKSCYGDAV*
12.	NOS1AP (492-503) <sup>‡</sup>	12	EL-GDSLDDDEIAV*
13.	pFructokinasa M (771-780)	10	EF-SRKRSGEAAV*
14.	Receptor $\alpha$ 1-Adrenérgico (452-465)	14	EF-LKIHTISLGENGEV*
15.	NIDD (416-429)	14	EF-LGTRTVGTPAEDIV*
16.	Vac14 (770-783)	14	EF-RSGRGDHLDRRVVL*
17.	CtBP-II (419-429)	11	EF-EADRDHASDQL*
18.	Receptor 2B de serotonina (465-479)	15	EF-TENDGDKVEDQVSYI*
19.	Receptor 1A de melatonina (342-353)	12	EF-ITNNNLIKVDSV*
20.	Transportador de serotonina Na <sup>+</sup> dependiente	15	EF-TPTEIPCGDIRMNAV*
21.	PMCA-4b (1193-1206)	14	EF-PQSDSLQSLQSV*
22.	ICAS12 (1142-1156)	15	EF-ASHPNSPLQSQETPV*

**Tabla 10.1:** Fragmentos de proteína clonados mediante la hibridación de oligonucleótidos. La región de RagA fue determinada por homología con las secuencias de Rab3D. <sup>‡</sup>Construcciones que fueron utilizadas para mutaciones puntuales, que se indican más adelante.

### 10.1.3. Construcciones de DYNLT1

El ADN complementario (ADNc) de DYNLT1 de ratón (UniProt ID: *mDYNLT1*, P51807) fue donado por el Dr. P. Sakmar [211] en un plásmido pET28. A partir de aquí, fue amplificado por PCR, flanqueado por los sitios *EcoRI* y *XhoI*, y se clonó en los plásmidos de doble híbrido pGAD y pGBT9, en el plásmido de expresión recombinante pKLSLt, y de ahí, en el pEGFPmod (ver más adelante).

El ADNc de DYNLT1 de *H. sapiens* (*hDYNLT1*, UniProt ID: P63172) fue cedido por el Dr. László Nyitray, en el plásmido pBH4, inserto entre las dianas de restricción *Bam*HI y *Xho*I.

Para la expresión en células de mamíferos, se obtuvieron varias construcciones:

**pmCherry:** Se extrajo DYNLT1 murino (*mDYNLT1*) de la construcción pKLSLt–DYNLT1 con las enzimas *Eco*RI y *Xho*I, y se insertó en el plásmido pmCherry–DYNLL (modificado por el Dr. Rapali para tener el sitio *Eco*RI en fase), entre las dianas *Eco*RI y *Sal*I.

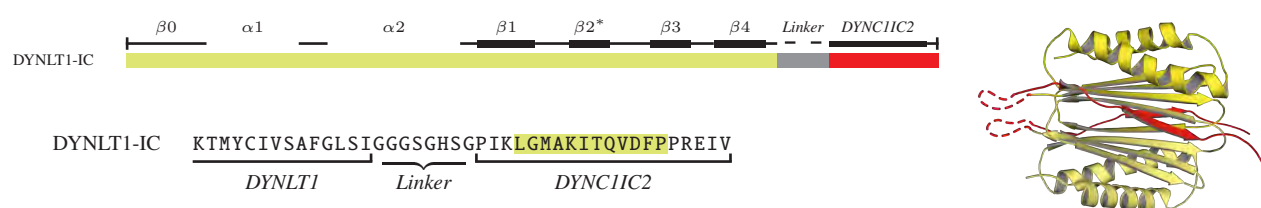
**pEGFPmod:** Durante el diseño del plásmido pEGFPmod, el molde de origen de la lectina fue la construcción pKLSLt–DYNLT1. De aquí se extrajo el *cassette* completo y se insertó en el pEGFP, como se ha descrito anteriormente.

**p3xFLAG:** Por PCR, se amplificó *mDYNLT1* a partir del pKLSLt entre las dianas de restricción *Bsp*EI (*Mro*I) y *Bam*HI, presentes en el MCS del 3xFlag, y se clonó por ligación directa.

**pUnGFP:** Para expresar una forma de DYNLT1 sin *tag* de fusión, se diseñó otra modificación del pEGFP. *mDYNLT1* fue proporcionado en el plásmido pET23, el cual contiene las dianas *Nhe*I en fase y *Hind*III en el extremo Ct, que son compatibles con los sitios *Nhe*I del inicio del pEGFP (justo precediendo a la GFP) y un *Hind*III del MCS. La clonación se realiza por digestión y ligaciones directas.

#### 10.1.4. Diseño de la forma autosaturada de DYNLT1

Como modelo experimental, se diseñó una versión de DYNLT1 en el que se fusiona el sitio de interacción en DYNC1I2 en el extremo Ct de una unidad monomérica de DYNLT1, de tal forma que, hipotéticamente, al plegarse, se inserta en la interfase del dímero de DYNLT1, ocupándolo y evitando la interacción de otras proteínas que utilicen el mismo sitio. Se desarrolló esta construcción en varios plásmidos, cada uno con una estrategia de clonación diferente, descritos a continuación.



**Figura 10.1:** Modelo de la construcción quimérica de DYNLT1 autosaturada con DIC.

**pGAD:** Por PCR se amplificó *mDYNLT1* añadiendo la diana de restricción *Mun*I ( $\equiv$  *Mfe*I, compatible con *Eco*RI) en ambos extremos y un pequeño conector (–GGGSGQF–). Por otro lado, la construcción pGAD–DYNC1I2(133-154) se digiere con *Eco*RI para abrir el plásmido e insertar el fragmento de *mDYNLT1* amplificado. Al ser ambos extremos compatibles, puede insertarse en los dos sentidos, pero se selecciona la orientación adecuada por el tamaño de la banda de una digestión con *Hind*III (presente en el plásmido).



**pGBT9:** La misma estrategia que en el pGAD. El plásmido de partida, en este caso contiene el fragmento 130-160 de DYNC1I1.

**pBH4:** Se realizaron dos PCRs en paralelo. En una, se amplificó el cDNA de hDYNLT a partir del pBH4-DYNLT1. En la otra, se amplificó el fragmento de DYNC1I2 a partir de la construcción previa pGAD-DYNLT1-DYNC1I2. Ambos amplicones contienen una región solapante en el conector (-GGGSGHSG-) que permite su hibridación y ligación.

**pmCherry:** A partir de la construcción pBH4-DYNLT1-DYNC1I2 se puede extraer el fragmento completo hDYNLT1-IC con una digestión *Bam*HI-*Xho*I. El plásmido pmCherry-DYNLL1 fue digerido con *Bgl*II (compatible con *Bam*HI) y con *Sal*I (compatible con *Xho*I). A continuación, los fragmentos fueron ligados entre sí.

**pEGFPmod:** El plásmido pEGFPmod, contiene en su extremo Ct un sitio *Hind*III. Con este en mente, se diseñó una PCR para amplificar el constructo mDYNLT1-IC2 a partir del pGAD-DYNLT1-DYNC1I2, flanqueado por las dianas *Eco*RI y *Hind*III. La digestión con estas enzimas de restricción y posterior ligación genera la construcción mDYNLT1-IC2 conectados por la secuencia -GGGSGQF-.

### 10.1.5. Clonación de la cadena intermedia

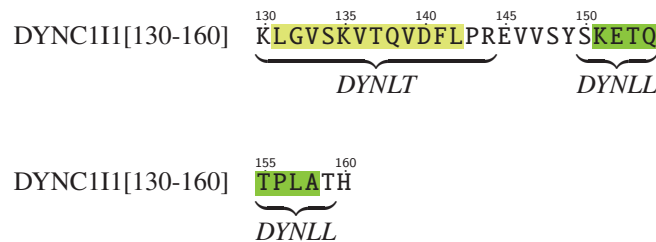
La DIC de las dineínas está considerada el sustrato canónico de las cadenas ligeras, y es utilizado como control positivo en nuestros experimentos. Por ello se crearon diferentes versiones de DIC para su uso en dobles híbridos, expresión recombinante y expresión celular. Todas las construcciones están hechas por medio de una amplificación por PCR de los fragmentos deseados a partir de DYNC1I2 completa (UniProt ID: O88485), proporcionada generosamente por el Dr. Zhang [161]. Se describen a continuación las construcciones creadas, numeradas según la isoforma IC1A de *M. musculus*.

**Full length:** Proteína completa para expresión celular (3xFLAG, sitios *Bsp*EI y *Bam*HI) y experimentos de fluorescencia (pmCherry, sitios perdidos *Bam*HI con *Bgl*II y *Xho*I con *Sal*I).

**1-160:** Región Nt que incluye los sitios de unión de DYNLT y DYNLL. Clonada para expresión recombinante (pKLSLt) y dobles híbridos (pGAD y pGBT9).

**1-130:** Región Nt sin incluir los sitios de unión de las cadenas ligeras, utilizada como control negativo en dobles híbridos.

**130-160:** Segmento corto, aislando específicamente los sitios de unión de DYNLT y DYNLL. Amplificada por PCR y clonada en pKLSLT para expresión recombinante y en los plásmidos para dobles híbridos pGAD y pGBT9. A partir de la construcción silvestre se diseñaron un conjunto de mutantes puntuales para analizar en profundidad la secuencia.



**Figura 10.2:** Segmento de DYNC1I1(130-160) indicando los sitios de unión de DYNLT1/Tctex1 y DYNLL1/DLC8.

### 10.1.6. Clonación de las GTPasas pequeñas moleculares

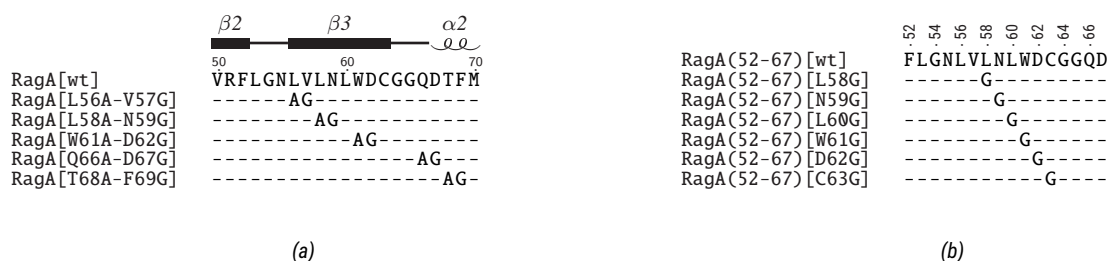
Dos trabajos describieron la interacción de sendas GTPasas con Tctex1, RagA [197] y Rab3D [216], en una región conservada entre ellas y con otras GTPasas. Para explorar la relación entre las GTPasas y DYNLT1, se clonaron en los diversos plásmidos utilizados en nuestro laboratorio.

**RagA** (*H. sapiens*,  $\equiv$  FIP-1 y RRAG, UniProt ID: Q7L523) fue proporcionado por el Dr. Takeshi Sekiguchi [283], en el plásmido pAS404 para dobles híbridos de levaduras. A partir de aquí se diseñaron todas las mutaciones y se extrajo para su clonación en otros vectores.

Mediante la técnica de hibridación de oligonúcleótidos, se diseñaron un conjunto de oligopéptidos que abarcan la supuesta región de interacción con DYNLT1 (RagA[52-67]) en los que se fueron mutando los residuos indicados por glicocola. Estos dúplex se insertaron en el plásmido pGBT9 para dobles híbridos. Alternativamente, el dúplex de RagA silvestre se insertó en el plásmido pEGFP.

A partir del plásmido original, se clonó RRAG completa en el plásmido de expresión pBH4 mediante la técnica del *Gibson Assembly* [284, 285] con el kit comercial de New England Biolabs (NEB), según las instrucciones del fabricante.

Tanto RagA como el mutante doble W61A-D62G también fueron clonados en el plásmido de expresión celular pEGFP mediante una amplificación por PCR a partir del pAS404-RagA.



**Figura 10.3:** Secuencias de los mutantes utilizados en los experimentos de dobles híbridos con RagA. a) Mutantes dobles creados sobre la proteína completa de RagA; b) Mutantes simples construidos sobre el segmento corto RagA(52-67)

**Rab3D** (*M. musculus*, UniProt ID: P35276) fue generosamente donado por el Dr. Jiake Xu [216] en un plásmido pBMT, de donde fue extraído por digestión directa con las enzimas de restricción *EcoRI*

y *SalI* y posterior ligación en los mismos sitios de los vectores de dobles híbridos pGAD y pGBT9. Alternativamente, se diseñaron oligonucleótidos con la secuencia descrita en el trabajo de Pavlos de 2011 (-QIWDTAGQERYTITTAYRGA- [216] que se insertaron en los plásmidos pGAD y pGBT9 de dobles híbridos, y en el pEGFP de expresión celular.

Por otra parte, se insertó Rab3D completa en el plásmido pBH4 mediante la técnica del *Gibson Assembly*. Para determinar la estabilidad estructural, sobre esta construcción para expresión recombinante, se crearon por el método *quickchange* los mutantes Glu74Ala y Trp76Ala.

**Otras GTPasas:** Para los ensayos de cosedimentación utilizados para identificar otras posibles proteínas del grupo de las GTPasas pequeñas moleculares que interaccionen con DYNLT1, se seleccionó un conjunto de GTPasas. Por un lado, se clonó la región equivalente a la descrita para Rab3D y Raga en las proteínas descritas en la tabla 10.1, insertándose en el plásmido pEGFP. Por otro, se hizo uso de una serie de GTPasas clonadas previamente en nuestro laboratorio, habiendo insertado las proteínas completas en el plásmido pEGFP. Es el caso de las GTPasas de N-Ras, H-Ras y R-Ras, TC10 y RhoB.

### 10.1.7. Clonación de la nNOS y el dominio PDZ

Para los diversos estudios realizados con el dominio PDZ de la nNOS fue necesario crear varias construcciones para la expresión recombinante, los dobles híbridos de levadura y los ensayos en células.

#### Clonación de nNOS para expresión recombinante

Para los estudios estructurales del dominio PDZ de la nNOS se realizaron varias construcciones abarcando diferentes segmentos de la proteína, siendo el más adecuado el fragmento nNOS(14-131), que recoge el dominio PDZ seguido de una horquilla  $\beta$ . Fue clonado en un plásmido modificado, en el que se ha traspasado el casete completo de la lectina del pKLSLt y el sitio de corte de la proteasa TEV al plásmido pET23a, a la vez que se añadieron dos residuos de glicocola para favorecer la digestión por la proteasa. El inserto está flanqueado por las enzimas *EcoRI* y *XhoI*.

## 10.2. Cultivos celulares

Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado durante su mantenimiento. Las células COS7 y HEK293T son células adherentes, y cuando alcanzan entre el 90 y el 100 % de confluencia deben pasar por un tratamiento con tripsina al 0.05 % y EDTA al 0.02 %, conocido como tripsinización, dos o tres veces por semana.

Para los experimentos de expresión celular, las células fueron transfectadas según las instrucciones del fabricante del reactivo de transfección Turbofect, que se describe brevemente a continuación:

Se siembran las células para que tengan el 60-80 % de confluencia en el momento de la transfección, cuando se incuban dos horas con el medio de transfección. Se preparan tubos *ependorf* con medio Optimem, donde se añaden los plásmidos a transfectar y el reactivo de transfección, se incuban 25 minutos a temperatura ambiente, se añaden sobre las células, y se incuban en las condiciones habituales. La mayoría de los plásmidos transfectados portan una proteína fluorescente, por lo que se puede controlar el nivel de expresión por microscopía de epifluorescencia a las 24 y 48 horas. Normalmente se recolectan las células a las 48h, momento que alcanza el máximo nivel de expresión.

### 10.3. Expresión recombinante de proteínas

Para la expresión de proteínas recombinantes se utilizaron sistemas bacterianos basados en la expresión de la polimerasa del fago T7. Las proteínas de interés fueron clonadas en los vectores de expresión y se introdujeron por transformación en la cepa de bacterias *E. coli* BL21(DE3). Normalmente se crece un cultivo 1-2 L a 37 °C y 230 rpm hasta una densidad óptica a 600 nm entre 0.7 y 1 unidades de absorbancia, momento en el que se induce con isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactósido (IPTG) a 0.5 mM, y se incuban de 4 a 16 horas. La temperatura de inducción es variable según las diferentes proteínas. El cultivo es recolectado por centrifugación a 7000 rpm, 4 °C durante 30 minutos, con un rotor Fiberlite F10, en una centrífuga Sorvall. El sedimento bacteriano puede ser almacenado a -20 °C durante varios meses.

#### 10.3.1. Purificación con el *tag* de lectina

La lectina hemolítica del hongo *Laetiporus sulphureus* se une con alta afinidad a las resinas de agarosa, por lo que las columnas cromatográficas de Sefarosa 4B pueden ser utilizadas para su retención específica por afinidad. Traducida como *tag* de fusión junto a una proteína de interés, proporciona una alta solubilidad y un método rápido y eficiente de purificación [282].

El sedimento bacteriano se resuspende en 100 ml de tampón de lisis (Tris 50 mM) con los inhibidores de proteasas (iP) (aprotinina, leupeptina, PMSF), lisozima (0.2 g/L) y agente reductor ( $\beta$ -ME). Se puede aplicar un tratamiento con DNasa I (Roche) para degradar el ADN y reducir la viscosidad de la suspensión. Manteniendo en hielo, se somete a tres ciclos de sonicación de dos minutos, con una separación de un minuto entre ellos, y se clarifica el lisado bacteriano por ultracentrifugación (15000 rpm, 20 min a 4 °C). Finalmente se filtra y se carga en una columna de Sefarosa 4B, previamente equilibrada con tampón de equilibrado (Tris 50 mM, NaCl 200 mM y  $\beta$ -ME). Se lava con 200 ml de tampón de lavado (Tris 100 mM, NaCl 25 mM, iP y  $\beta$ -ME), y se eluye con tampón de elución (Tris 50 mM, lactosa 200 mM). El seguimiento de la elución se realiza por absorción a 280 nm. Para eliminar el *tag* de lectina, se somete a digestión con la proteasa de TEV.

### 10.3.2. Expresión con el *tag* de 6xHis

El *tag* de 6xHis consiste en un oligopéptido de seis histidinas consecutivas, que son capaces de unirse a iones metálicos coordinados con nitrilo triacético inmovilizado en una resina de agarosa, y permite una purificación selectiva de gran rendimiento.

El sedimento bacteriano es resuspendido en 50 ml de tampón NF, suplementado con inhibidores de proteasas y lisozima, y mantenido en hielo. El uso de agentes reductores no es recomendado porque reduce y precipita el níquel de la columna, aunque se pueden añadir un máximo de 10 mM de  $\beta$ -ME. Se somete a 3 ciclos de sonicación de un minuto en pulsos de 1 segundo, y se clarifica el lisado por ultracentrifugación. Se filtra y se carga en una columna de Ni-NTA, previamente equilibrada con tampón NF. Se lava la columna consecutivamente con 100 ml de NF y 100 ml + 20 mM de imidazol. Opcionalmente, y para eliminar otras impurezas asociadas inespecíficamente, se puede lavar con otros 100 ml de NF con 40 mM de imidazol. La elución se realiza con tampón NF y 200 mM de imidazol, y se sigue por absorción a 280 nm. La proteína eluida se somete a digestión con la proteasa TEV.

### 10.3.3. Digestión con la proteasa del TEV)

La proteasa TEV, TEVp, es una útil herramienta utilizada habitualmente para la eliminación de los *tags* de fusión durante la purificación de las proteínas recombinantes. Reconoce la secuencia XLY $\phi$ Q/ $\phi$ , siendo óptima la secuencia ENLYFQ/G.

Se utilizan preparaciones de TEVp purificadas mediante un *tag* de 6xHis en nuestro laboratorio y almacenadas a -80 °C. A las proteínas eluidas de las columnas de afinidad se añade 1/100 del volumen eluido durante la purificación, y se incuba durante la diálisis. Las condiciones de digestión son un tampón de Tris a 50 mM y NaCl a 150 mM o en HBS, suplementado con 1 mM de DTT como agente reductor, un pH entre 7 y 7.5 y temperatura ambiente, pudiendo desarrollarse a 4 °C. En general, la digestión se completa a más del 90 % en 48 h, aunque en el caso de la construcción del PDZ de la nNOS se necesita hasta una semana para una digestión superior al 80 %. El progreso de la digestión se puede seguir por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.

### 10.3.4. Producción recombinante del dominio PDZ de la nNOS

Todos los experimentos *in vitro* fueron realizados con proteína producida de manera recombinante en un sistema bacteriano. Se clonó el fragmento nNOS(14-131), que incluye el dominio PDZ y la horquilla  $\beta$  (construcción denominada PDZ $\beta$ h), en el plásmido pET23a, modificado para incorporar la lectina del hongo *Laetiporus sulphureus* procedente del plásmido pKLSLt [282]. La proteína expresada se purifica muy eficazmente en una columna de afinidad a la Sefarosa 4B, y se obtiene en un sólo paso una gran cantidad de proteína de elevada pureza. La proteína obtenida de esta forma es una quimera, en el que el PDZ de la nNOS está fusionado a continuación de la lectina utilizada para la retención en la columna de cromatografía, y separados por una secuencia de corte para la TEVp. Esta

secuencia conectora tiene además una extensión de tres glicocolas que fue necesario añadir para obtener una digestión adecuada del *tag* de fusión, digestión que aún así necesita una semana de incubación para superar el 80 %. En los experimentos en los que la técnica es dependiente de la estructura (como el CD o la RMN), el proceso de purificación incluye este paso de digestión, mientras que en otros ensayos, dado que el *tag* de lectina es un dominio de plegamiento independiente e inerte, no interfiere en el plegamiento ni función del PDZ, se utilizó la quimera lectina-PDZ $\beta$ h(lecPDZ) sin cortar.

### 10.3.5. Expresión recombinante en células de mamíferos

Para solventar algunos de los problemas relacionados con las posibles modificaciones post-traduccionales de las proteínas de mamíferos, se diseñó el plásmido pEGFPmod-Lectina-DYNLT1 (ver 10.1.1), y esta construcción fue transfectada en células COS7. Para maximizar la masa celular, se sembraron y transfectaron placas de 10 cm de diámetro. A los dos días después de la transfección, la placa se lava tres veces con PBS y se lisan las células con 1 ml por placa de tampón de lisis - *RadioimmunoPrecipitation Assay* (RIPA). Se retiran los restos celulares insolubles por centrifugación y el sobrenadante (fracción post-nuclear) se pasa por una minicolumna de Sefarosa 4B preparada en una pipeta pasteur, para retener la proteína fusionada a la lectina. Se lava abundantemente con PBS y se eluye con 200 mM de lactosa. Es difícil seguir la elución por absorción, debido al bajo rendimiento de la preparación, la cual no sale extremadamente pura, pero sí lo suficiente para poder realizar los experimentos de pepscan o cosedimentación.

## 10.4. Cosedimentación

Para analizar las interacciones entre proteínas en un contexto de células de mamífero, se realizaron transfecciones y cotransfecciones para la sobre-expresión transitoria de las proteínas que supuestamente forman un complejo *in vivo*. Mediante las técnicas de cosedimentación (*pull-down*) de la lectina, o inmunoprecipitación, se sedimenta específicamente uno de los componentes del complejo, y en la inmunodetección se trata de detectar con anticuerpos el otro componente.

Las células son transfectadas y tras 48 horas, se lavan con PBS, se levantan y procesan en tubos de 1.5 ml con tampón de lisis RIPA, y son sometidas a centrifugación suave para eliminar la fracción nuclear. El extracto celular se procesa entonces de forma diferente según el tipo de experimentos a realizar:

**Cosedimentación con el *tag* de lectina** Como se ha descrito anteriormente, la lectina del hongo *L. sulphureus* permite la purificación por cromatografía de afinidad en columnas de Sefarosa 4B. Una adaptación de esta técnica permite retener selectivamente a la lectina y su proteína de fusión en un extracto celular. Por afinidad, la lectina sobreexpresada se une a la Sefarosa 4B, que sedimenta con facilidad, arrastrando con ello a la lectina, a la proteína de fusión, y a las proteínas que haya asociadas.

Tras la preparación del extracto celular, se añade la resina de Sefarosa 4B, abundantemente lavada con PBS, hasta un volumen aproximado de unos 50 µl por cada 200 µl de extracto, y se voltea suavemente para permitir la mezcla homogénea. Tras una incubación de 4 horas, se centrifuga a baja velocidad y se retira el primer sobrenadante. Se lava tres veces con PBS, mediante la adición de 50 µl de PBS y centrifugación, y al sedimento resultante se le añade el tampón de aplicación para su separación electroforética y su análisis por inmunodetección con los anticuerpos específicos.

**Inmunoprecipitación** Una forma de hacer también una sedimentación específica es la inmunoprecipitación, que consiste en la formación de inmunocomplejos y la sedimentación de los anticuerpos por su asociación a la proteína A de *S. aureus*. La proteína A reconoce específicamente la fracción cristizable (Fc) de los anticuerpos, especialmente las inmunoglobulinas G (IgG). Está suministrada en un polvo liofilizado, que se hidrata con PBS o *RadioimmunoPrecipitation Assay* (RIPA), y a partir de ahí se prepara una suspensión en de una mezcla 1:1 de proteína A con Sefarosa 4B. Una vez obtenida la fracción post-nuclear, se añaden entre 3 y 10 µl de los anticuerpos de inmunoprecipitación, que reconocen una proteína específica. Se incuban 2 horas, y se añade la suspensión de proteína A-Sepharose 4B, en proporción 1:2 con relación al volumen de extracto, y se incuba durante 4 h, tras lo cual se centrifuga a baja velocidad para sedimentar los inmunocomplejos y separar el sobrenadante. Se realizan tres lavados con PBS, y se analiza el sedimento por electroforesis e inmunodetección.

## 10.5. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Para los estudios de localización subcelular y colocalización de proteínas, se montaron las preparaciones para su observación en el microscopio confocal. Se pueden seguir dos estrategias para la obtención de las señales de fluorescencia específicas: la sobreexpresión transitoria de las proteínas de estudio fusionadas a las proteínas fluorescentes GFP y mCherry, o el reconocimiento selectivo con anticuerpos específicos, y su etiquetado con anticuerpos secundarios con un fluoróforo conjugado.

En ambos casos, se trabajó con células COS7 sembradas sobre cubreobjetos de microscopía óptica, previamente esterilizados y tapizados con una solución de colágeno, donde se someten a los tratamientos pertinentes para su crecimiento y transfección. Una vez obtenidas, las células son lavadas abundantemente con PBS, fijadas con PFA al 2 % en PBS durante 5 min, y sus membranas son permeabilizadas con metanol puro frío (-20 °C), realizándose lavados con PBS entre cada tratamiento. Si las células tienen que ser etiquetadas con anticuerpos, éstas se incuban con los anticuerpos primarios adecuados, a una dilución 1/200, en una solución de BSA al 1 % en PBS durante dos horas. Tras varios lavados con PBS, se incuban con el anticuerpo secundario, conjugados con los fluoróforos FITC o rodamina, en iguales condiciones. A continuación se monta el cubreobjetos con las células sobre un portaobjetos, con el medio de montaje Fluoroshield™ con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Ex = 358 nm, Em = 461 nm) para la tinción de los núcleos.

Las preparaciones fueron analizadas en el CAI de Citometría y Microscopia de Fluorescencia de

la UCM, utilizando los microscopios Leica y Olympus. Las imágenes obtenidas fueron procesadas y analizadas con el programa ImageJ [286], distribuido en el paquete Fiji (*Fiji is just ImageJ*)[287].

## 10.6. Electroforesis e inmunodetección

Para el análisis de las proteínas, se realizó siempre una separación por electroforesis en gel de poliacrilamida y en presencia de SDS. Habitualmente, la poliacrilamida se prepara al 15 %, que produce un entramado adecuado para la separación resolutive de todas las proteínas con las que se trabaja.

**Las proteínas recombinantes** se analizan, y se realiza un seguimiento de la purificación por electroforesis seguida de tinción con azul de Coomassie (Brilliant Blue R250), que permite detectar la proteína recombinante y la presencia de contaminantes.

**La inmunodetección con anticuerpos** se realiza transfiriendo las proteínas, después de la electroforesis, a membranas de nitrocelulosa (Amershan), y en algunos casos de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon P, Millipore). Éstas se tapizan con leche desnatada en polvo al 3 % en PBS, y se incuban con los anticuerpos primarios adecuados, disueltos en PBS con leche al 1.5 %, durante 2h. Tras tres lavados con PBS, se incuban con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano (*HorseRadish Peroxidase*, HRP) durante dos horas, y se vuelven a lavar con PBS. A continuación, se revela la inmunodetección por quimioluminiscencia (*quimioluminiscencia potenciada* (ECL), ThermoScientific) con cámara Las3000 de Fujifilm, o en película fotográfica.

## 10.7. Dobles híbridos de levaduras

El doble híbrido de levaduras es un ensayo que permite analizar la interacción entre proteínas en un ambiente celular. Consiste en la reconstitución selectiva del factor de transcripción GAL4 por la interacción de las proteínas de interés, que permite la expresión de algunos genes reporteros. Las proteínas de estudio se clonan en fase como proteínas de fusión en el extremo Ct de los dominios de unión al ADN (aminoácidos 1-147) o el de *trans*-activación (aminoácidos 768-811) del factor de transcripción GAL4, de tal forma que si hay interacción se reconstruye su actividad. El factor de transcripción GAL4 se une en secuencias activadoras (*Upstream Activating Sequences*, UAS) presentes en los promotores de los genes reporteros, y activa selectivamente los genes *HIS3*, para la síntesis de histidina, *LacZ* para la síntesis de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, y *MEL1* para la síntesis de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa.

En los experimentos de dobles híbridos se utilizó la cepa Y190 de *S. cerevisiae*, levaduras auxótrofas para los aminoácidos leucina, triptófano e histidina (ver tabla 9.1). El triptófano y la leucina son marcadores de transformación, y están proporcionados por los genes de síntesis incluidos en los plásmidos, mientras que la lisina, la adenina y el uracilo se suministran en el medio. La histidina



se complementa como resultado positivo del propio ensayo. En la cepa Y190, el gen *HIS3* está estrictamente controlado por el UAS sensible al GAL4, pero, alternativamente, su promotor mínimo permite un escape a este control, causando una expresión basal que debe ser inhibida con la adición del inhibidor 3-amino-1,2,4-triazol (3AT).

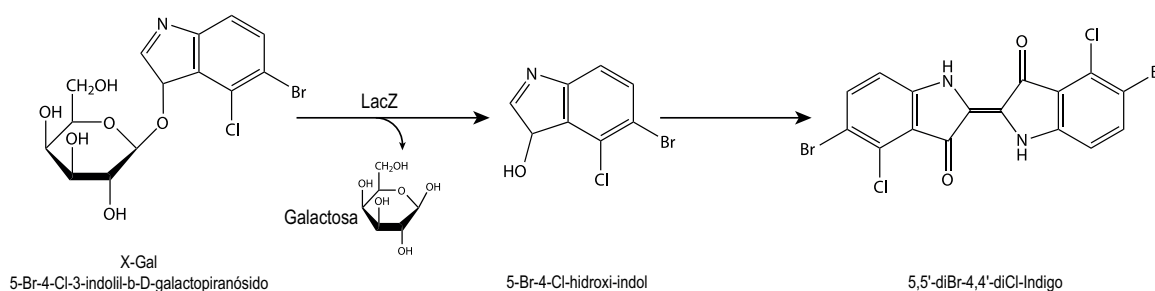
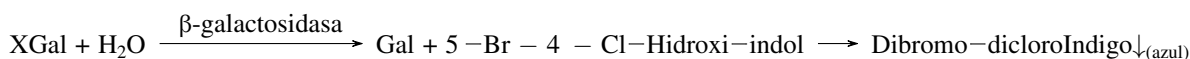
La transformación de las levaduras se realiza según el método del acetato de litio [288]. Se crece una colonia de levaduras Y190 competentes en 10 ml de YPDA, y se dejan crecer a 30 °C y 200 rpm hasta una densidad óptica a 600 nm de  $\approx 1,5$ , que toma unas 15 h. A continuación se inocula un cultivo de 50 ml, y se crece hasta una  $DO^{600nm} \approx 0,6$ , momento en el que se recolectan por centrifugación a 3500 rpm durante 5 min y a temperatura ambiente, para eliminar el medio de cultivo. El sedimento de levaduras se resuspende en agua milliQ estéril y se vuelven a centrifugar, volviendo a descartar el sobrenadante. Las levaduras pueden ser transformadas siguiendo los pasos siguientes en condiciones de esterilidad:

1. Preparar previamente la solución de transformación: para cada transformación, 400  $\mu$ l de polietilenglicol (PEG) 3500 al 50 % p/v, 140  $\mu$ l;
2. Resuspender el sedimento de levaduras en 400  $\mu$ l de acetato de litio 100  $\mu$ M, habiendo añadido 40  $\mu$ l del *DNA carrier* (Sigma);
3. Añadir 100  $\mu$ l de la suspensión de levaduras a la mezcla de 0.5  $\mu$ g de cada plásmido;
4. Sobre ellos, añadir 600  $\mu$ l de la solución de transformación y mezclar bien.;
5. Incubar 30 minutos a 30 °C;
6. Añadir 70  $\mu$ l de DMSO e incubar 15 minutos a 42 °C;
7. Choque térmico de dos minutos en hielo, y centrifugación de 5 minutos a 4 °C, a máxima velocidad;
8. Resuspensión en 200  $\mu$ l de agua MilliQ estéril;
9. Repartir cada transformación en placas selectivas de SUDAK, suplementadas con His o con 3AT.

Las placas se incuban entonces a 30 °C, unos 3 a 5 días hasta que aparezcan las colonias transformantes. Las placas con histidina actúan como control de transformación, pues el medio de cultivo es deficiente en triptófano y leucina, que son complementados por la incorporación de los plásmidos a la levadura. Una vez se hayan obtenido colonias de levaduras transformantes, a partir de las placas de 3AT se traspasan las colonias seleccionadas a una placa de histidina, donde crecerán sin restricciones durante tres días. A continuación se hace una réplica y se crecen en papel Whattman estéril, sobre una placa de histidina durante otros tres días. Entonces se realiza el ensayo cromogénico del X-Gal para la confirmación de los positivos.

El ensayo del X-Gal consiste en la detección de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *LacZ*, cuya transcripción se ha inducido gracias a la acción del factor Gal4 reconstruido, sólo en los transformantes cuyas proteínas de fusión dan una interacción positiva. La  $\beta$ -galactosidasa actúa sobre el enlace  $\beta$ -glicosídico del X-Gal, liberando galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxi-indol, el cual dimeriza espontáneamente hacia 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo, que precipita con un color azul intenso. Por

un lado se rompen las células crecidas en el papel Whatman (GE Healthcare) con un baño de un minuto en nitrógeno líquido, y por otro se prepara la mezcla de reacción: 3 mg de X-Gal se disuelven en 30  $\mu$ l de DMF, y ésto se añade a 3 ml de tampón Z con 8.1  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol. Con esta solución se empapa un papel Whatman, sobre el que se coloca el papel con las levaduras, y se incuba en oscuridad a 30 °C. Se hace un seguimiento de la reacción cada 30 minutos durante la primera hora, y después cada hora durante al menos cinco horas. En los casos en que la interacción es muy fuerte, es necesario un seguimiento más continuado durante la primera hora.



**Figura 10.4:** Reacción de degradación del X-Gal y formación del compuesto que precipita con un intenso color azul.

## 10.8. Pepscan

La técnica del pepscan (*peptide array scanning*) comienza en la síntesis de oligopéptidos en soporte sólido por el método SPOT<sup>TM</sup>, asociados a un soporte de celulosa por un conector de polietilenglicol al carboxilo terminal. La síntesis se produce, por tanto, en sentido contrario al biológico, añadiendo los nuevos aminoácidos en el extremo amino terminal. La secuencia de una proteína puede estar representada en su totalidad por una matriz peptídica. La técnica está bien revisada en el trabajo de Katz et al, y es muy ilustrativa la Figura 1 [289]. Existen varias aproximaciones para el uso de esta técnica. Una de ellas es la síntesis de oligopéptidos solapantes que permite la definición precisa de secuencias de interacción. Por otro lado, se puede diseñar cualquier tipo de secuencia para indagar en los requerimientos secuenciales para una interacción [290].

Las membranas de celulosa son hidratadas con PBS y tapizadas con PBS-leche al 2 %. A continuación, se incuban con la proteína de interés a unos 40  $\mu$ g/ml durante la noche a temperatura ambiente, y se lavan tres veces con PBS. Para hacer la detección se pueden seguir dos métodos: 1) realizar directamente la detección de las proteínas asociadas sobre la membrana, o 2) transferir las proteínas desde el soporte sólido a una membrana de nitrocelulosa para una inmunodetección tradicional.

Para nuestros experimentos de pepscan, las membranas fueron proporcionadas por el grupo del Dr. Fernando Roncal y el Dr. Juan Pablo Albar, en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Para analizar las secuencias de las proteínas que interaccionan con DYNLT1, se sintetizaron un conjunto

de membranas con la mayoría de las proteínas descritas. A su vez, para definir los requerimientos sobre la secuencia canónica de cadena intermedia, se diseñó una membrana en la que se sustituyeron cada uno de los aminoácidos de la isoforma DYNC1I1 (KLGVSQVTQVDFLPR) por todos los demás aminoácidos proteicos.

## 10.9. Calorimetría de titulación

La calorimetría es una técnica que permite analizar en profundidad el proceso físico de una interacción. Las características termodinámicas de una reacción química, como es una interacción molecular, están determinadas por la estequiometría de asociación, la constante de asociación, y la variación de energía libre, entalpía, entropía y capacidad calorífica. Mediante la técnica de ITC es posible obtener todos estos parámetros directamente, en un único experimento que proporciona las variables independientes  $K_a$ ,  $n$  y  $\Delta H^\circ$ , que permiten el cálculo de las variables dependientes  $\Delta G^\circ$  y  $\Delta S^\circ$ . Un buen desarrollo teórico de la técnica está recogido en la bibliografía [291, 292].

Los experimentos de calorimetría ITC fueron desarrollados en un calorímetro VP-ITC de Microcal. Las proteínas son expresadas y purificadas a homogeneidad en los sistemas recombinantes descritos y dializadas en tampón HBS, al pH indicado para cada caso. La diferencia de pH entre la solución en celda y la solución en la jeringa deben ser menores a 0.1 unidades. Los péptidos son disueltos en agua a una concentración stock de 20 mM, y disueltos en el mismo tampón que la proteína en el momento del experimento a una concentración entre 0.1 y 1 mM. Todos los componentes son degasificados durante 5 min. En general, el reactivo limitante es la cantidad de proteína y su pureza, y suelen ir en la celda, reservándose la titulación en la jeringa para el péptido. Las concentraciones de muestras en celda y jeringa son indicados en cada caso, y se calcula la concentración de proteína ([M]) de tal forma que el valor adimensional  $C$  caiga en el rango 10-500 (10.1), y la de ligando ([L]) sea tal que, al finalizar el experimento, se cumpla la relación  $[L]/[M] > 2 : 1$ .

$$C = K_a[M]_t n \quad (10.1)$$

Las condiciones de los experimentos, salvo que se indique lo contrario, son las que siguen: 30 inyecciones de 7.5  $\mu$ l con una separación de 5 min entre ellas y  $T = 25^\circ\text{C}$ .

### 10.9.1. Análisis de datos

Antes del experimento, algunos valores pueden ser introducidos para automatizar los cálculos posteriores, como la concentración de proteína en la celda de muestra, o ligando en la jeringa. Estos valores son utilizados por el programa para los ajustes, y pueden ser modificados posteriormente. La curva obtenida tras un experimento de ITC está en términos de potencial aplicado para compensar la diferencia de temperatura entre la celda de muestra y la de referencia causada por la reacción, y viene dada en  $\mu\text{cal s}^{-1}$ . La integración del área de los picos da el valor de  $\Delta H$ . A partir de estos datos, y

mediante un ajuste matemático por un proceso iterativo para un modelo de un sólo sitio de unión, realizado por el programa dedicado del instrumento (Origin7®) permite obtener  $n$  y  $K_a$ , con los que y aplicando las ecuaciones termodinámicas (10.5) se calculan el resto de parámetros como  $\Delta S$  y  $\Delta G$ :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{kcal mol}^{-1}) \quad (10.2)$$

$$\Delta S = -\frac{\Delta G - \Delta H}{T} \quad (\text{kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}) \quad (10.3)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_a = RT \ln K_d \quad (\text{kcal mol}^{-1}) \quad (10.4)$$

$$(10.5)$$

A continuación, se puede hacer una serie de ajustes y correcciones:

- Conociendo la estequiometría real de la interacción, se puede hacer una corrección de la concentración efectiva posterior al experimento aplicando la 10.6:

$$C_{\text{real}} = C_{\text{ini}} \frac{n_{\text{ori}}}{n_{\text{th}}} \quad (10.6)$$

e introduciendo este nuevo valor de concentración en el campo adecuado del programa Origin® permite volver a realizar el ajuste.

- Con los parámetros obtenidos, y la concentración inicial puede calcularse el valor experimental de  $c$  de la 10.1, y confirmar que cae en el rango de sensibilidad.
- Para eliminar la aportación de la dilución del tampón, se puede realizar un experimento en exactamente las mismas condiciones, en la que se inyecta ligando sobre tampón, una situación que no genera calor de reacción, y posteriormente sustraer matemáticamente los valores obtenidos a los experimentos. Alternativamente, se puede inyectar un ligando no relacionado que no produzca calor de interacción.

## 10.10. Dicroísmo circular

El CD es una técnica espectroscópica basada en la diferencia de absorción de luz polarizada de las moléculas quirales. La luz polarizada es aquella cuyo campo eléctrico oscila en un único plano, que puede verse como la superposición de dos haces de luz polarizada perpendicularmente, o dos haces polarizados circularmente, de igual fase y amplitud pero de sentidos opuestos. En este último caso, un cromóforo quiral puede absorber (reducir la amplitud) o refractar (desplazar la fase) diferencialmente ambos componentes ( $A_L$  y  $A_R$ ), y tiene por tanto un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) diferente para cada uno ( $\epsilon_L$  y  $\epsilon_R$ ). Se define el CD como la diferencia de absorción de los dos componentes (10.7):

$$\Delta A = A_L - A_R = \Delta \epsilon Cl \quad (10.7)$$

$$[\theta] = \theta \frac{1}{10C_M l} \quad (10.8)$$

Para el estudio de la estructura secundaria de las proteínas, el cromóforo es el enlace peptídico, cuya absorción está en el ultravioleta lejano y tiene un espectro de CD característico para cada tipo de estructura secundaria [293]. Al ser una unidad repetitiva, se debe estimar la aportación media de cada unidad al espectro global, mediante la elipticidad media por residuo  $[\theta]_{MRW}$ , que permite a su vez la comparación de espectros entre diferentes experimentos, calculada según la  $[\theta]$  ecuación 10.9.

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta}{l n C_M} \times 10^6 \quad (10.9)$$

en donde la elipticidad  $\theta$  se introduce en mdeg, el paso óptico ( $l$ ) en mm y la concentración molar ( $C_M$ ) en  $\mu M$ .  $n$  es el número de enlaces peptídicos, y  $10^6$  es el factor de conversión para obtener la elipticidad molar por residuo en  $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ . Las mediciones de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-715, el cual proporciona los datos en milidegrees (mdeg), que son procesados con el programa Spectra Manager (v1.54) para la obtención de los espectros finales.

### 10.10.1. Curvas de desnaturalización térmica

La señal de dicroísmo circular de las proteínas es muy dependiente de su estructura secundaria, y los cambios conformacionales pueden ser detectados por variaciones de su señal dicróica. Fijando la longitud de onda en 222 nm, que es la longitud de onda donde generalmente hay mayor diferencia hay entre una proteína plegada y su estado desnaturalizado, se hace un seguimiento de la conformación global en función de la temperatura. En los casos analizados durante esta Tesis se obtienen curvas sigmoideas, donde se puede definir el punto medio de la transición conformacional ( $T_m$ ) y dar una idea de la cooperatividad de la transición. Cuando una proteína ha unido su ligando, la formación de nuevas interacciones moleculares con respecto a la proteína vacía permiten una mayor resistencia a la desnaturalización inducida por calor, que se traduce en un desplazamiento de esta  $T_m$  a valores mayores. Puede ser utilizada como una técnica cuantitativa, aunque en los experimentos desarrollados aquí se utilizaron las transiciones del CD como meros indicadores de la unión del péptido, donde un mayor desplazamiento suele implicar la formación de un complejo más estable.

## 10.11. Resonancia magnética nuclear

La RMN permite obtener información estructural a partir de la respuesta de los núcleos magnéticos a un campo magnético aplicado externamente, respuesta que depende directamente del entorno de cada núcleo. Los experimentos de RMN fueron llevados a cabo por dos grupos colaboradores, los trabajos con DYNLT1 fueron realizados en colaboración con la Dra. Marta Bruix (Instituto de Química Física Rocasolano, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)), mientras que

los experimentos con el dominio PDZ de la nNOS fueron realizados junto a la Dra. María Ángeles Canales, en el CAI de espectroscopía de la UCM.

En términos generales, las muestras fueron preparadas en tampones a base de fosfatos (100 mM  $\text{K}_2\text{PO}_4$ , suplementadas con agua deuterada (10 %  $\text{D}_2\text{O}$ ), 1 mM de DTT como agente reductor y 50  $\mu\text{M}$  de 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sodio (DSS) como estándar para los desplazamientos químicos. Las señales fueron asignadas siguiendo los protocolos experimentales habituales en dos y tres dimensiones enumerados a continuación. Los experimentos  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, HNCA, HN(CA)CO, HN(CO)CA, CBCANH, CBCA(CO)NH y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC permiten la asignación de los átomos del esqueleto peptídico, los experimentos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, HC(C)H-TOCSY y (H)CCH-TOCSY dan información sobre los átomos de las cadenas laterales, con experimentos particulares para los aminoácidos aromáticos, y los experimentos NOESY permiten introducir las restricciones de distancias atómicas.

**DYNLT1** fue expresada y purificada a homogeneidad en medio mínimo suplementado con  $^{15}\text{N}$ , y concentrada en tubos de centrifugación (Amicon Ultra) hasta una concentración de entre 50 y 200  $\mu\text{M}$ . Una vez adquiridos y asignados los espectros, se utilizaron los péptidos de DIC, RagA, Rab3D y Lfc (ver la tabla 9.3) para los diferentes estudios. Los péptidos para las titulaciones fueron preparados a altas concentraciones de solución en  $\text{H}_2\text{O}$ . Se adquirieron a continuación los espectros  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de las proteínas en ausencia y en presencia de cantidades crecientes de los péptidos, abarcando ratios de 1:0 a 1:6 de proteína:péptido.

**DYNLT1-IC** La proteína quimérica DYNLT1 autosaturada con el fragmento fusionado de DYNC11I fue expresada en medio mínimo M9 suplementado con  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$ , y purificada a homogeneidad para obtener preparaciones de gran pureza y alta concentración. Los espectros de RMN fueron adquiridos en un espectrómetro de RMN Bruker Advance 800 MHz (Bruker, Alemania) equipado con una criosonda de gradiente z a 35 °C. Los desplazamientos químicos del protón fueron referenciados internamente respecto a la señal del DSS, y los desplazamientos heteronucleares de manera indirecta. Los cambios de los desplazamientos químicos ( $\Delta\delta$ ) fueron realizados con los valores de desplazamiento químico medios ponderados al  $^{15}\text{N}$  y  $^1\text{H}$ , según la ecuación [244].

$$\Delta\delta_{\text{av}} = \sqrt{\frac{(\Delta\delta^1\text{H})^2 + [(\Delta\delta^{15}\text{N})^2]}{10}} \quad (10.10)$$

## 10.12. Polarización de fluorescencia

La polarización o anisotropía de fluorescencia es una técnica espectroscópica que permite determinar los cambios en la emisión de luz polarizada dependientes del tamaño molecular del fluoróforo. La vida media del estado excitado de un fluoróforo (i.e. el tiempo entre que es excitado hasta que emite la fluorescencia) está en una escala temporal comparable a la de la rotación de las moléculas en

solución debidas al movimiento Browniano, que depende del tamaño molecular. Al excitar un fluoróforo con luz polarizada, éste emite también fluorescencia polarizada, y al rotar la molécula en el espacio se modifica a su vez el plano de polarización emitido. En solución, los fluoróforos se mueven libremente, con lo que la luz emitida globalmente carece polarización y tiene una anisotropía mínima. Sin embargo, al restringir los movimientos moleculares, como cuando se aumenta el volumen molecular, se disminuye la rotación y se induce un cierto grado de polarización en la luz emitida de la solución, que será mayor cuanto más grande es el fluoróforo. Esta propiedad permite analizar interacciones moleculares, porque al haber una interacción, aumenta el tamaño global del complejo, y aumenta el grado de polarización. Se hace una buena descripción de las técnicas de anisotropía de fluorescencia en la literatura [294].

La anisotropía ( $r$ ) se describe con la ecuación 10.11:

$$r = \frac{(I_{\parallel} - I_{\perp})}{(I_{\parallel} + 2)} = \frac{(I_{\parallel}/I_{\perp} - 1)}{(I_{\parallel}/I_{\perp} + 2)} \quad (10.11)$$

donde  $I_{\parallel}$  es la intensidad de fluorescencia detectada cuando el plano de polarización es paralelo al de la luz emitida, mientras que  $I_{\perp}$  es la intensidad en el plano perpendicular. La anisotropía es la diferencia de la intensidad entre el plano paralelo y el plano perpendicular en relación a la intensidad total emitida, y se relaciona con la polarización de fluorescencia ( $P$ ) según la ecuación 10.12:

$$r = \frac{2P}{3 - P} \quad (10.12)$$

La anisotropía se puede relacionar con la vida media del estado excitado del fluoróforo ( $\tau$ ) y la movilidad ( $\tau_c$ ), mediante la ecuación de Perrin 10.13:

$$r = \frac{r_0}{(1 + \frac{\tau}{\tau_c})} \quad (10.13)$$

donde  $r_0$  es el límite superior de anisotropía, o el estado de mínima movilidad.

El tiempo de correlación rotacional (ecuación 10.14) es dependiente de la masa molecular ( $M_w$ ), de la viscosidad de la solución ( $\eta$ ) y el volumen específico de la molécula  $\bar{v}_h$ :

$$\tau_c = \frac{\eta M_w \bar{v}_h}{RT} \quad (10.14)$$

En un experimento típico, se titula concentraciones crecientes de una proteína grande sobre una concentración determinada de un fluoróforo pequeño, y la mezcla de cada punto se excita con luz polarizada verticalmente, detectándose para cada punto la intensidad emitida en los planos vertical y horizontal. La anisotropía medida se reajusta con la anisotropía inicial ( $r_i$ ), y se puede ajustar a un modelo de asociación hiperbólico:

$$(r - r_i) = \frac{(r_{\max} - r_i)C}{K_d + C} \quad (10.15)$$

donde  $C$  es la concentración de la proteína, y se puede extraer la constante de disociación ( $K_d$ ) de la formación del complejo.

Los experimentos de anisotropía de fluorescencia fueron realizados para analizar con una técnica complementaria las interacciones de proteínas con péptidos. En todos los casos, se mantuvieron los péptidos fluorescentes, marcados con FITC (resumidos en la tabla 9.4) a una concentración de 100 nm, sobre la que se añadieron concentraciones crecientes de la proteína de estudio en un volumen total de 400  $\mu$ l. Las curvas hiperbólicas fueron ajustadas al modelo descrito en la ecuación 10.15 utilizando el programa OriginPro (v8).

### 10.13. Técnicas bioinformáticas

Además de la metodología técnica aplicada para desarrollar los experimentos, se hizo uso de numerosas herramientas informáticas que permitieron un mejor análisis, procesado y presentación de los datos.

Todas las imágenes de las estructuras tridimensionales de las proteínas fueron realizadas con el programa PyMOL (v1.3) [295] a partir de las coordenadas depositadas en la base de datos PDB [296], cuyo código identificador se indica en cada caso. En algunas de las imágenes se ha modelado la secuencia de una proteína de la cual no se tiene su información tridimensional sobre una estructura conocida, utilizando el programa Modeller (v9.5) [190]. Las representaciones del potencial electrostático superficial fueron generadas mediante el cálculo de las interacciones electrostáticas de los modelos moleculares tridimensionales con la resolución de la ecuación de Poisson-Boltzmann a través del servidor web dedicado (<http://www.poissonboltzmann.org/docs/home/>) [264]. Se generaron algunos modelos de la interacción de péptidos sobre la superficie de las proteínas de estudio, a partir de los datos obtenidos por cambios de desplazamientos químicos de los espectros de RMN. Para ello se utilizó el programa HADDOCK [274, 275], a través del servidor We-NMR (<http://haddock.science.uu.nl/enmr/services/HADDOCK/>) [273, 297]

Los alineamientos de secuencias fueron preparados con el programa Clustal Omega a través del servidor web del Instituto Europeo de Bioinformática (*The European Bioinformatics Institute*, EBML-EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) [298], y fueron representados con el paquete T<sub>E</sub>Xshade [299]. Las secuencias consenso de los ligandos de DYNLL1 y del PDZ de la nNOS fueron presentadas en forma de un logotipo de secuencia (*sequence logo*), en el que se tiene en cuenta la frecuencia de cada aminoácido en cada posición, mediante la ecuación 10.16 [300], y fueron generadas por T<sub>E</sub>Xshade.

$$I(P_i) = \log |\Sigma| + \sum P_{ij} \log_2 P_{ij} \quad (10.16)$$





# Bibliografía

- [1] David S. Bredt, P. M. Hwang, C. E. Glatt, C. Lowenstein, R. R. Reed, y Solomon H. Snyder. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 351: 714–718, 1991.
- [2] Ulrich Förstermann y William C. Sessa. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33(7):829–37, 837a–837d, 2012.
- [3] J. Ignacio Rodríguez-Crespo, Pierre Moënné-Loccoz, Thomas M. Loehr, y Paul R. Ortiz De Montellano. Endothelial nitric oxide synthase: Modulations of the distal heme site produced by progressive N-Terminal Deletions. *Biochemistry*, 36(28):8530–8538, 1997.
- [4] B. Hemmens, W. Goessler, K. Schmidt, y B. Mayer. Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46):35786–35791, 2000.
- [5] J. S. Scheele, E. Bruner, T. Zemojtel, P. Martásek, L. J. Roman, B. S. Masters, V. S. Sharma, y D. Magde. Kinetics of CO and NO ligation with the Cys(331)→Ala mutant of neuronal nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry*, 276(7):4733–6, 2001.
- [6] Elsa D. Garcin, Christopher M. Bruns, Sarah J. Lloyd, David J. Hosfield, Mauro Tiso, Ratan Gachhui, Dennis J. Stuehr, John A. Tainer, y Elizabeth D. Getzoff. Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry*, 279(36):37918–27, 2004.
- [7] C. R. Nishida y P. R. O. de Montellano. Autoinhibition of Endothelial Nitric-oxide Synthase: IDENTIFICATION OF AN ELECTRON TRANSFER CONTROL ELEMENT. *Journal of Biological Chemistry*, 274(21):14692–14698, 1999.
- [8] Giselle M. Knudsen, Clinton R. Nishida, Sean D. Mooney, y Paul R. Ortiz de Montellano. Nitric-oxide synthase (NOS) reductase domain models suggest a new control element in endothelial NOS that attenuates calmodulin-dependent activity. *The Journal of biological chemistry*, 278(34):31814–24, 2003.
- [9] Ulrich Förstermann, Ellen I. Closs, Jennifer S. Pollock, Masaki Nakane, Petra Schwarz, Ingo Gath, y Hartmut Kleinert. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 23(6\_Pt\_2):1121–1131, 1994.

- [10] Li Zhou y Dong-Ya Zhu. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, 20(4):223–30, 2009.
- [11] Clara Aicart-Ramos. *Papel del modulo carboxi-terminal de las Óxido Nítrico Sintetas en la regulacion de la síntesis de  $\text{Á}\text{u}\text{NO}$ : Caracterización del receptor nuclear E75, un sensor de óxido nítrico*. Phd thesis, Universidad Complutense de Madrid, 2013.
- [12] Gerald A Rameau, Ling-Yu Chiu, y Edward B Ziff. Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor. *The Journal of biological chemistry*, 279(14):14307–14, 2004.
- [13] Tao Song, Naoya Hatano, Mariko Horii, Hiroshi Tokumitsu, Fuminori Yamaguchi, Masaaki Tokuda, y Yasuo Watanabe. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I inhibits neuronal nitric-oxide synthase activity through serine 741 phosphorylation. *FEBS letters*, 570(1-3):133–7, 2004.
- [14] Gerald A Rameau, David S Tukey, Elsa D Garcin-Hosfield, Roseann F Titcombe, Charu Misra, Latika Khatri, Elizabeth D Getzoff, y Edward B Ziff. Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(13):3445–55, 2007.
- [15] Jay E Brenman, Daniel S Chao, Houhui Xia, Ken Aldape, y David S Bredt. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 82(5):743–752, 1995.
- [16] Jay E. Brenman, Daniel S. Chao, Stephen H. Gee, Aaron W. McGee, Sarah E. Craven, Daniel R. Santillano, Ziqiang Wu, Fred Huang, Houhui Xia, Matthew F. Peters, Stanley C. Froehner, y David S. Bredt. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and  $\alpha$ 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*, 84(5):757–767, 1996.
- [17] Ignacio Rodríguez-Crespo, W. Straub, Francisco Gavilanes, y Paul R. Ortiz de Montellano. Binding of dynein light chain (PIN) to neuronal nitric oxide synthase in the absence of inhibition. *Archives of biochemistry and biophysics*, 359(2):297–304, 1998.
- [18] Brian J. Hillier, Karen S. Christopherson, Kenneth E. Prehoda, David S. Bredt, y Wendell A. Lim. Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5415):812–815, 1999.
- [19] Yi Lai, Junling Zhao, Yongping Yue, y Dongsheng Duan.  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 3 helices of dystrophin R16 and R17 frame a microdomain in the  $\alpha$ 1 helix of dystrophin R17 for neuronal NOS binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(2):525–30, 2013.
- [20] Samie R. Jaffrey y Solomon H. Snyder. PIN: An Associated Protein Inhibitor of Neuronal Nitric Oxide Synthase, 1996.

- [21] S Lamas, P a Marsden, G K Li, P Tempst, y T Michel. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(14):6348–6352, 1992.
- [22] Belén Yélamos, Fernando Roncal, Juan Pablo Albar, Ignacio Rodríguez-Crespo, y Francisco Gavilanes. Influence of acylation of a Peptide corresponding to the amino-terminal region of endothelial nitric oxide synthase on the interaction with model membranes. *Biochemistry*, 45(4):1263–70, 2006.
- [23] Andrew M Batchelor, Katalin Bartus, Clare Reynell, Sophie Constantinou, Edward J Halvey, Kara F Held, Wolfgang R Dostmann, Jeffrey Vernon, y John Garthwaite. Exquisite sensitivity to subsecond, picomolar nitric oxide transients conferred on cells by guanylyl cyclase-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(51):22060–5, 2010.
- [24] R Govers y T J Rabelink. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *American journal of physiology. Renal physiology*, 280(2):F193–206, 2001.
- [25] F H Guo, H R De Raeve, T W Rice, D J Stuehr, F B Thunnissen, y S C Erzurum. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17):7809–13, 1995.
- [26] Clara Aicart-Ramos y Ignacio Rodríguez-Crespo. Binding of PDZ domains to the carboxy terminus of inducible nitric oxide synthase boosts electron transfer and NO synthesis. *FEBS letters*, 589(17):2207–12, 2015.
- [27] Inmaculada Navarro-Lérida, Mónica Martínez-Moreno, Iván Ventoso, Alberto Álvarez-Barrientos, y Ignacio Rodríguez-Crespo. Binding of CAP70 to Inducible Nitric Oxide Synthase and Implications for the Vectorial Release of Nitric Oxide in Polarized Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 18(July):2768–2777, 2007.
- [28] Inmaculada Navarro-Lérida, Maria Martha Corvi, Alberto Alvarez Barrientos, Francisco Gavilanes, Luc Gérard Berthiaume, y Ignacio Rodríguez-Crespo. Palmitoylation of inducible nitric-oxide synthase at Cys-3 is required for proper intracellular traffic and nitric oxide synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 279(53):55682–9, 2004.
- [29] Inmaculada Navarro-Lérida, Alberto Alvarez-Barrientos, y Ignacio Rodríguez-Crespo. N-terminal palmitoylation within the appropriate amino acid environment conveys on NOS2 the ability to progress along the intracellular sorting pathways. *Journal of cell science*, 119(Pt 8):1558–69, 2006.
- [30] Salvador Moncada y Annie Higgs. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *New England Journal of Medicine*, 329(27):2002–2012, 1993.
- [31] T J O'Dell, R D Hawkins, E R Kandel, y O Arancio. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24):11285–9, 1991.

- [32] E. Schuman y D. Madison. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, 254(5037):1503–1506, 1991.
- [33] Antonio Martínez-Ruiz, Susana Cadenas, y Santiago Lamas. Nitric oxide signaling: Classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free radical biology & medicine*, 51(1):17–29, 2011.
- [34] M.W.J. Cleeter, J.M. Cooper, V.M. Darley-USmar, S. Moncada, y A.H.V. Schapira. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. *FEBS Letters*, 345(1):50–54, 1994.
- [35] Weiming Xu, Ian G Charles, y Salvador Moncada. Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial respiration and the endoplasmic reticulum stress response. *Cell research*, 15(1):63–5, 2005.
- [36] Mónica Martínez-Moreno, Antonio Martínez-Ruiz, Alberto Alvarez-Barrientos, Francisco Gavilanes, Santiago Lamas, y Ignacio Rodríguez-Crespo. Nitric oxide down-regulates caveolin-3 levels through the interaction with myogenin, its transcription factor. *The Journal of biological chemistry*, 282(32): 23044–54, 2007.
- [37] Clara Aicart-Ramos, Margarita Valhondo Falcón, Paul R Ortiz de Montellano, y Ignacio Rodríguez-Crespo. Covalent attachment of heme to the protein moiety in an insect E75 nitric oxide sensor. *Biochemistry*, 51(37):7403–16, 2012.
- [38] Michael A. Marletta. Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78(6): 927–930, 1994.
- [39] Uma Siddhanta, Chaoqun Wu, Husam M. Abu-Soud, Jingli Zhang, Dipak K. Ghosh, y Dennis J. Stuehr. Heme iron reduction and catalysis by a nitric oxide synthase heterodimer containing one reductase and two oxygenase domains. *Journal of Biological Chemistry*, 271(13):7309–7312, 1996.
- [40] Albert Y Hung y Morgan Sheng. PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *The Journal of biological chemistry*, 277(8):5699–702, 2002.
- [41] Fei Ye y Mingjie Zhang. Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. *The Biochemical journal*, 455(1):1–14, 2013.
- [42] C P Ponting. Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 6(2):464–8, 1997.
- [43] Chad M Petit, Jun Zhang, Paul J Sapienza, Ernesto J Fuentes, y Andrew L Lee. Hidden dynamic allostery in a PDZ domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(43):18249–54, 2009.
- [44] Rhiannon R. Penkert, Heather M. DiVittorio, y Kenneth E. Prehoda. Internal recognition through PDZ domain plasticity in the Par-6-Pals1 complex. *Nature structural & molecular biology*, 11(11):1122–7, 2004.

- [45] Michael A. Stiffler, Jiunn R. Chen, Viara P. Grantcharova, Ying Lei, Daniel Fuchs, John E. Allen, Lioudmila A. Zaslavskaja, y Gavin MacBeath. PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5836):364–9, 2007.
- [46] Eunjoon Kim y Morgan Sheng. PDZ domain proteins of synapses. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(10):771–781, 2004.
- [47] Wei Feng y Mingjie Zhang. Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(2):87–99, 2009.
- [48] Jan Schepens, Edwin Cuppen, Bé Wieringa, y Wiljan Hendriks. The neuronal nitric oxide synthase PDZ motif binds to -G(D,E)XV(\*) carboxyterminal sequences. *FEBS Letters*, 409(1):53–56, 1997.
- [49] H Tochio, Y K Mok, Q Zhang, H M Kan, D S Bredt, y M Zhang. Formation of nNOS/PSD-95 PDZ dimer requires a preformed beta-finger structure from the nNOS PDZ domain. *Journal of molecular biology*, 303(3):359–70, 2000.
- [50] Nicole L. Stricker, Karen S. Christopherson, Byunfdoo A. Yi, Peter J. Schatz, Ronald W. Raab, Glenn Dawes, Douglas E. Bassett, David S. Bredt, y Min Li. PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences. *Nature biotechnology*, 15:336–342, 1997.
- [51] Samie R. Jaffrey, Adele M. Snowman, Mikael J L Eliasson, Noam a. Cohen, y Solomon H. Snyder. CAPON: A protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron*, 20:115–124, 1998.
- [52] H Tochio, Q Zhang, P Mandal, M Li, y M Zhang. Solution structure of the extended neuronal nitric oxide synthase PDZ domain complexed with an associated peptide. *Nature structural biology*, 6(5):417–421, 1999.
- [53] B. L. Firestein y D. S. Bredt. Interaction of Neuronal Nitric-oxide Synthase and Phosphofructokinase-M. *Journal of Biological Chemistry*, 274(15):10545–10550, 1999.
- [54] T. Ort. The receptor tyrosine phosphatase-like protein ICA512 binds the PDZ domains of beta2-syntrophin and nNOS in pancreatic beta-cells. *European Journal of Cell Biology*, 79(9):621–630, 2000.
- [55] P. Manivet. PDZ-dependent Activation of Nitric-oxide Synthases by the Serotonin 2B Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13):9324–9331, 2000.
- [56] K. Schuh, S. Uldrijan, M. Telkamp, N. Rothlein, y L. Neyses. The plasmamembrane calmodulin-dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I. *The Journal of cell biology*, 155(2):201–5, 2001.
- [57] G M Riefler y B L Firestein. Binding of neuronal nitric-oxide synthase (nNOS) to carboxyl-terminal-binding protein (CtBP) changes the localization of CtBP from the nucleus to the cytosol: a novel function for targeting by the PDZ domain of nNOS. *The Journal of biological chemistry*, 276(51):48262–8, 2001.

- [58] Fuminori Saitoh, Qing Bao Tian, Akira Okano, Hiroyuki Sakagami, Hisatake Kondo, y Tatsuo Suzuki. NIDD, a novel DHHC-containing protein, targets neuronal nitric-oxide synthase (nNOS) to the synaptic membrane through a PDZ-dependent interaction and regulates nNOS activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28):29461–29468, 2004.
- [59] Tiziana Persichini, Valeria Mazzone, Fabio Polticelli, Sandra Moreno, Giorgio Venturini, Emilio Clementi, y Marco Colasanti. Mitochondrial type I nitric oxide synthase physically interacts with cytochrome c oxidase. *Neuroscience letters*, 384(3):254–9, 2005.
- [60] Jean-François Lemaire y Peter S. McPherson. Binding of Vac14 to neuronal nitric oxide synthase: Characterisation of a new internal PDZ-recognition motif. *FEBS Letters*, 580:6948–6954, 2006.
- [61] B Chanrion, C Mannoury la Cour, F Bertaso, M Lerner-Natoli, M Freissmuth, M J Millan, J Bockaert, y P Marin. Physical interaction between the serotonin transporter and neuronal nitric oxide synthase underlies reciprocal modulation of their activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19):8119–24, 2007.
- [62] Raffi Tonikian, Yingnan Zhang, Stephen L Sazinsky, Bridget Currell, Jung-Hua Yeh, Boris Reva, Heike A Held, Brent A Appleton, Marie Evangelista, Yan Wu, Xiaofeng Xin, Andrew C Chan, Somasekar Seshagiri, Laurence A Lasky, Chris Sander, Charles Boone, Gary D Bader, y Sachdev S Sidhu. A specificity map for the PDZ domain family. *PLoS biology*, 6(9):e239, 2008.
- [63] Y. Hamazaki, M. Itoh, H. Sasaki, M. Furuse, y S. Tsukita. Multi-PDZ Domain Protein 1 (MUPP1) Is Concentrated at Tight Junctions through Its Possible Interaction with Claudin-1 and Junctional Adhesion Molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1):455–461, 2001.
- [64] Manfred Schliwa y Günther Woehlke. Molecular motors. *Nature*, 422(6933):759–65, 2003.
- [65] K. Kevin Pfister, Paresh R. Shah, Holger Hummerich, Andreas Russ, James Cotton, Azlina Ahmad Annuar, Stephen M. King, y Elizabeth M. C. Fisher. Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families. *PLoS genetics*, 2(1):e1, 2006.
- [66] Bill Wickstead y Keith Gull. The evolution of the cytoskeleton. *The Journal of cell biology*, 194(4): 513–25, 2011.
- [67] Aristides G. Diamant y Andrew P. Carter. Dynein Family Classification. In Gordon C. K. Roberts, editor, *Encyclopedia of Biophysics*, pages 552–558. Springer Berlin Heidelberg, 1 edition, 2013.
- [68] C J Lawrence, N R Morris, R B Meagher, y R K Dawe. Dyneins have run their course in plant lineage. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2(5):362–363, 2001.
- [69] K. Kevin Pfister, Elizabeth M. C. Fisher, Ian R. Gibbons, Thomas S. Hays, Erika L. F. Holzbaur, J. Richard McIntosh, Mary E. Porter, Trina A. Schroer, Kevin T. Vaughan, George B. Witman, Stephen M. King, y Richard B. Vallee. Cytoplasmic dynein nomenclature. *The Journal of cell biology*, 171(3): 411–3, 2005.

- [70] Patricia S. Vaughan, John D. Leszyk, y Kevin T. Vaughan. Cytoplasmic Dynein Intermediate Chain Phosphorylation Regulates Binding to Dynactin. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28):26171–26179, 2001.
- [71] Stephen J King, Myriam Bonilla, Michael E Rodgers, y Trina a Schroer. Subunit organization in cytoplasmic dynein subcomplexes. *Protein science*, 11(5):1239–1250, 2002.
- [72] John C Williams, Petra L Roulhac, Anindya G Roy, Richard B Vallee, Michael C Fitzgerald, y Wayne a Hendrickson. Structural and thermodynamic characterization of a cytoplasmic dynein light chain-intermediate chain complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(24):10028–33, 2007.
- [73] Enza Maria Valente, Rasim O. Rosti, Elizabeth Gibbs, y Joseph G. Gleeson. Primary cilia in neurodevelopmental disorders. *Nature Reviews Neurology*, 10(1):27–36, 2013.
- [74] Manfred Fliegauf, Thomas Benzing, y Heymut Omran. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(11):880–893, 2007.
- [75] Hiroaki Ishikawa y Wallace F Marshall. Ciliogenesis: building the cell’s antenna. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(4):222–34, 2011.
- [76] Peter Höök y Richard B Vallee. The dynein family at a glance. *Journal of cell science*, 119(Pt 21):4369–71, 2006.
- [77] Fernando Aniento, Neil Emans, Gareth Griffiths, y Jean Gruenberg. Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *Journal of Cell Biology*, 123(6 PART 1):1373–1387, 1993.
- [78] C Valetti, D M Wetzel, M Schrader, M J Hasbani, S R Gill, T E Kreis, y T a Schroer. Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Molecular biology of the cell*, 10(12):4107–4120, 1999.
- [79] C Roghi y V J Allan. Dynamic association of cytoplasmic dynein heavy chain 1a with the Golgi apparatus and intermediate compartment. *Journal of cell science*, 112 ( Pt 2):4673–4685, 1999.
- [80] C Itin, N Ulitzur, B Mühlbauer, y S R Pfeffer. Mapmodulin, cytoplasmic dynein, and microtubules enhance the transport of mannose 6-phosphate receptors from endosomes to the trans-golgi network. *Molecular biology of the cell*, 10(7):2191–2197, 1999.
- [81] Anja Habermann, Trina A Schroer, Gareth Griffiths, y Janis K Burkhardt. Immunolocalization of cytoplasmic dynein and dynactin subunits in cultured macrophages: enrichment on early endocytic organelles. *Journal of cell science*, 114(Pt 1):229–240, 2001.
- [82] A. Harada, Y. Takei, Y. Kanai, Y. Tanaka, S. Nonaka, y N. Hirokawa. Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *Journal of Cell Biology*, 141(1):51–59, 1998.



- [83] Andrew W Tai, J Z Chuang, y Ching-Hwa H Sung. Cytoplasmic dynein regulation by subunit heterogeneity and its role in apical transport. *The Journal of cell biology*, 153(7):1499–509, 2001.
- [84] S J Susalka, W O Hancock, y K K Pfister. Distinct cytoplasmic dynein complexes are transported by different mechanisms in axons. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1496(1):76–88, 2000.
- [85] Ayumu Yamamoto y Yasushi Hiraoka. Cytoplasmic dynein in fungi: insights from nuclear migration. *Journal of cell science*, 116(Pt 22):4501–12, 2003.
- [86] Daehwan Kim, Eunae You, y Sangmyung Rhee. Dynein regulates cell migration depending on substrate rigidity. *International Journal of Molecular Medicine*, 29(3):440–446, 2012.
- [87] a. Wynshaw-Boris y M. J. Gambello. LIS1 and dynein motor function in neuronal migration and development. *Genes and Development*, 15(6):639–651, 2001.
- [88] Jacob Shun-Jen Yang, Jia-Min Bai, y Tzumin Lee. Dynein-dynactin complex is essential for dendritic restriction of TM1-containing Drosophila Dscam. *PLoS ONE*, 3(10):e3504, 2008.
- [89] Brian T. Helfand, Atsushi Mikami, Richard B. Vallee, y Robert D. Goldman. A requirement for cytoplasmic dynein and dynactin in intermediate filament network assembly and organization. *Journal of Cell Biology*, 157(5):795–806, 2002.
- [90] S Busson, D Dujardin, a Moreau, J Dompierre, y J R De Mey. Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Current biology : CB*, 8:541–544, 1998.
- [91] Richard B Vallee, Dileep Varma, y Denis L Dujardin. ZW10 function in mitotic checkpoint control, dynein targeting and membrane trafficking: is dynein the unifying theme? *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(21):2447–51, 2006.
- [92] Jakub K Famulski, Larissa J Vos, Jerome B Rattner, y Gordon K Chan. Dynein/Dynactin-mediated transport of kinetochore components off kinetochores and onto spindle poles induced by nordihydroguaiaretic acid. *PloS one*, 6(1):e16494, 2011.
- [93] Jonne A. Raaijmakers, Marvin E. Tanenbaum, y René H. Medema. Systematic dissection of dynein regulators in mitosis. *The Journal of cell biology*, 201(2):201–15, 2013.
- [94] Jason R. Bader y Kevin T. Vaughan. Dynein at the kinetochore: Timing, Interactions and Functions. *Seminars in cell & developmental biology*, 21(3):269–75, 2010.
- [95] Eugeni A. Vaisberg, Michael P. Koonce, y J. Richard McIntosh. Cytoplasmic dynein plays a role in mammalian mitotic spindle formation. *The Journal of cell biology*, 123(4):849–858, 1993.
- [96] Andreas Merdes, Rebecca Heald, Kumiko Samejima, William C Earnshaw, y Don W Cleveland. Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA. *Journal of Cell Biology*, 149(4):851–861, 2000.

- [97] Jeffrey K Moore, Melissa D Stuchell-Brereton, y John a Cooper. Function of dynein in budding yeast: mitotic spindle positioning in a polarized cell. *Cell motility and the cytoskeleton*, 66(8):546–55, 2009.
- [98] Sher Karki y Erika L Holzbaur. Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport, 1999.
- [99] G J Pazour, C G Wilkerson, y G B Witman. A dynein light chain is essential for the retrograde particle movement of intraflagellar transport (IFT). *The Journal of cell biology*, 141(4):979–92, 1998.
- [100] Jonathan M Scholey. Intraflagellar transport. *Annual review of cell and developmental biology*, 19: 423–43, 2003.
- [101] Joel L Rosenbaum y George B Witman. Intraflagellar transport. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(11):813–825, 2002.
- [102] George B Witman. Dynein and intraflagellar transport. In Stephen M. King, editor, *Dyneins*, chapter 14, pages 394–421. Elsevier, 2012.
- [103] K Helen Bremner, Julian Scherer, Julie Yi, Michael Vershinin, Steven P Gross, y Richard B Vallee. Adenovirus transport via direct interaction of cytoplasmic dynein with the viral capsid hexon subunit. *Cell host & microbe*, 6(6):523–35, 2009.
- [104] Javier Merino-Gracia, María Flor García-Mayoral, y Ignacio Rodríguez-Crespo. The association of viral proteins with host cell dynein components during virus infection. *The FEBS journal*, 278(17): 2997–3011, 2011.
- [105] S R Gill, T a Schroer, I Szilak, E R Steuer, M P Sheetz, y Don W Cleveland. Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *The Journal of cell biology*, 115(6):1639–50, 1991.
- [106] N E Faulkner, D L Dujardin, C Y Tai, Kevin T. Vaughan, C B O’Connell, Y Wang, y R B Vallee. A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nature cell biology*, 2 (November):784–791, 2000.
- [107] Roger Karess. Rod-Zw10-Zwilch: A key player in the spindle checkpoint. *Trends in Cell Biology*, 15 (7):386–392, 2005.
- [108] Julia R Kardon y Ronald D Vale. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(12):854–65, 2009.
- [109] S R Gill, D W Cleveland, y T a Schroer. Characterization of DLC-A and DLC-B, two families of cytoplasmic dynein light chain subunits. *Molecular biology of the cell*, 5(6):645–654, 1994.
- [110] K.J. Palmer, Helen Hughes, y D.J. Stephens. Specificity of cytoplasmic dynein subunits in discrete membrane-trafficking steps. *Molecular biology of the cell*, 20(12):2885–2899, 2009.

- [111] Conor P Horgan, Sara R Hanscom, y Mary W McCaffrey. Dynein LIC1 localizes to the mitotic spindle and midbody and LIC2 localizes to spindle poles during cell division. *Cell biology international*, 35(2): 171–178, 2011.
- [112] Junghoon Ha, Kevin W H Lo, Kenneth R. Myers, Tiffany M. Carr, Michael K. Humsi, Bareza a. Rasoul, Rosalind a. Segal, y K. Kevin Pfister. A neuron-specific cytoplasmic dynein isoform preferentially transports TrkB signaling endosomes. *Journal of Cell Biology*, 181(6):1027–1039, 2008.
- [113] Andrew W Tai, Jen-Zeng Chuang, y Ching-Hwa Sung. Localization of Tctex-1, a cytoplasmic dynein light chain, to the Golgi apparatus and evidence for dynein complex heterogeneity. *The Journal of biological chemistry*, 273(31):19639–19649, 1998.
- [114] Kevin W-H Lo, John M Kogoy, y K Kevin Pfister. The DYNLT3 light chain directly links cytoplasmic dynein to a spindle checkpoint protein, Bub3. *The Journal of biological chemistry*, 282(15):11205–12, 2007.
- [115] Stan a Burgess, Matt L Walker, Hitoshi Sakakibara, Peter J Knight, y Kazuhiro Oiwa. Dynein structure and power stroke. *Nature*, 421(6924):715–8, 2003.
- [116] Helgo Schmidt, Ruta Zalyte, Linas Urnavicius, y Andrew P. Carter. Structure of human cytoplasmic dynein-2 primed for its power stroke. *Nature*, 518(7539):435–438, 2015.
- [117] Takahide Kon, Takuji Oyama, Rieko Shimo-Kon, Kenji Imamula, Tomohiro Shima, Kazuo Sutoh, y Genji Kurisu. The 2.8 Å crystal structure of the dynein motor domain. *Nature*, 484(7394):345–50, 2012.
- [118] K. Kevin Pfister, Mark W. Salata, James F. Dillman, Kevin T. Vaughan, Richard B. Vallee, Enrique Torre, y R. John Lye. Differential expression and phosphorylation of the 74-kDa intermediate chains of cytoplasmic dynein in cultured neurons and glia. *Journal of Biological Chemistry*, 271(3):1687–1694, 1996.
- [119] Anna Kuta, Wenhan Deng, Ali Morsi El-Kadi, Gareth T Banks, Majid Hafezparast, K Kevin Pfister, y Elizabeth M C Fisher. Mouse cytoplasmic dynein intermediate chains: identification of new isoforms, alternative splicing and tissue distribution of transcripts. *PloS one*, 5(7):e11682, 2010.
- [120] K. Kevin Pfister, Mark W. Salata, James F. Dillman, Enrique Torre, y R. John Lye. Identification and developmental regulation of a neuron-specific subunit of cytoplasmic dynein. *Molecular biology of the cell*, 7(2):331–343, 1996.
- [121] Mark W. Salata, James F. Dillman, R. John Lye, y K. Kevin Pfister. Growth factor regulation of cytoplasmic dynein intermediate chain subunit expression preceding neurite extension. *Journal of Neuroscience Research*, 65(5):408–416, 2001.
- [122] Kenneth R. Myers, Kevin W H Lo, R. John Lye, John M. Kogoy, Violetta Soura, Majid Hafezparast, y K. Kevin Pfister. Intermediate chain subunit as a probe for cytoplasmic dynein function: Biochemical analyses and live cell imaging in PC12 cells. In *Journal of Neuroscience Research*, volume 85, pages 2640–2647, 2007.

- [123] Bill Wickstead y Keith Gull. Dyneins across eukaryotes: a comparative genomic analysis. *Traffic*, 8(12): 1708–21, 2007.
- [124] Dmitry I. Nurminsky, Maria V. Nurminskaya, Elizaveta V. Benevolenskaya, Yuri Y. Shevelyov, Daniel L. Hartl, y Vladimir A. Gvozdev. Cytoplasmic dynein intermediate-chain isoforms with different targeting properties created by tissue-specific alternative splicing. *Molecular and cellular biology*, 18(11):6816–25, 1998.
- [125] Kevin W H Lo, Ho Man Kan, y K. Kevin Pfister. Identification of a novel region of the cytoplasmic dynein intermediate chain important for dimerization in the absence of the light chains. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14):9552–9559, 2006.
- [126] Kevin W-H Lo, John M Kogoy, Bareza a Rasoul, Stephen M King, y K Kevin Pfister. Interaction of the DYNLT (TCTEX1/RP3) Light Chains and the Intermediate Chains Reveals Novel Intersubunit Regulation during Assembly of the Dynein Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 282(51):36871–36878, 2007.
- [127] Carine Rosse, Katrina Boeckeler, Mark Linch, Simone Radtke, David Frith, Karin Barnouin, Ali Sayed Morsi, Majid Hafezparast, Michael Howell, y Peter J Parker. Binding of dynein intermediate chain 2 to paxillin controls focal adhesion dynamics and migration. *Journal of Cell Science*, 125(16):3733–3738, 2012.
- [128] Afua Nyarko, Michael Hare, Thomas S Hays, y Elisar Barbar. The intermediate chain of cytoplasmic dynein is partially disordered and gains structure upon binding to light-chain LC8. *Biochemistry*, 43 (49):15595–603, 2004.
- [129] Moses Makokha, Michael Hare, Mingang Li, Thomas Hays, y Elisar Barbar. Interactions of cytoplasmic dynein light chains Tctex-1 and LC8 with the intermediate chain IC74. *Biochemistry*, 41(13):4302–4311, 2002.
- [130] Gregory Benison, Afua Nyarko, y Elisar Barbar. Heteronuclear NMR identifies a nascent helix in intrinsically disordered dynein intermediate chain: implications for folding and dimerization. *Journal of molecular biology*, 362(5):1082–93, 2006.
- [131] S. H. Tynan, M. a. Gee, y R. B. Vallee. Distinct but overlapping sites within the cytoplasmic dynein heavy chain for dimerization and for intermediate chain and light intermediate chain binding. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42):32769–32774, 2000.
- [132] Courtney M Schroeder, Jonathan Ml Ostrem, Nicholas T Hertz, y Ronald D Vale. A Ras-like domain in the light intermediate chain bridges the dynein motor to a cargo-binding region. *eLife*, 3:1–22, 2014.
- [133] S. H. Tynan, A. Purohit, S. J. Doxsey, y R. B. Vallee. Light intermediate chain 1 defines a functional subfraction of cytoplasmic dynein which binds to pericentrin. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42): 32763–32768, 2000.

- [134] S M Hughes, Kevin T. Vaughan, J S Herskovits, y R B Vallee. Molecular analysis of a cytoplasmic dynein light intermediate chain reveals homology to a family of ATPases. *Journal of cell science*, 108 (Pt 1):17–24, 1995.
- [135] Elisar Barbar. Dynein Light Chain LC8 Is a Dimerization Hub Essential in Diverse Protein Networks. *Biochemistry*, 47(2):1–6, 2008.
- [136] Catherine L Day, Hamsa Puthalakath, Gretchen Skea, Andreas Strasser, Igor Barsukov, Lu-Yun Lian, David C S Huang, y Mark G Hinds. Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands. *The Biochemical journal*, 377(Pt 3):597–605, 2004.
- [137] László Radnai, Péter Rapali, Zsuzsa Hódi, Dániel Süveges, Tamás Molnár, Bence Kiss, Bálint Bécsi, Ferenc Erdödi, László Buday, József Kardos, Mihály Kovács, y László Nyitray. Affinity, avidity, and kinetics of target sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms. *The Journal of biological chemistry*, 285(49):38649–57, 2010.
- [138] K. Kevin Pfister, R B Fay, y G B Witman. Purification and polypeptide composition of dynein ATPases from *Chlamydomonas* flagella. *Cell motility*, 2(6):525–547, 1982.
- [139] Sharon E Benashski, Alistair Harrison, Ramila S. Patel-King, y Stephen M King. Dimerization of the highly conserved light chain shared by dynein and myosin V. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33):20929–20935, 1997.
- [140] Jun Liang, Samie R Jaffrey, Wei Guo, Solomon H Snyder, y Jon Clardy. Structure of the PIN/LC8 dimer with a bound peptide. *Nature structural biology*, 6(8):735–740, 1999.
- [141] Jing-Song Fan, Q Zhang, Hidehito Tochio, Ming Li, y Mingjie Zhang. Structural basis of diverse sequence-dependent target recognition by the 8 kDa dynein light chain. *Journal of molecular biology*, 306(1):97–108, 2001.
- [142] Wenning Wang, Kevin W-H Lo, Ho-Man Kan, Jing-Song Fan, y Mingjie Zhang. Structure of the monomeric 8-kDa dynein light chain and mechanism of the domain-swapped dimer assembly. *The Journal of biological chemistry*, 278(42):41491–9, 2003.
- [143] Moses Makokha, Yuanpeng Janet Huang, Gaetano Montelione, Arthur S Edison, y Elisar Barbar. The solution structure of the pH-induced monomer of dynein light-chain LC8 from *Drosophila*. *Protein Science*, 13:727–734, 2004.
- [144] Gregory Benison, P Andrew Karplus, y Elisar Barbar. Structure and dynamics of LC8 complexes with KXTQT-motif peptides: swallow and dynein intermediate chain compete for a common site. *Journal of molecular biology*, 371(2):457–68, 2007.
- [145] Gregory Benison, P Andrew Karplus, y Elisar Barbar. The interplay of ligand binding and quaternary structure in the diverse interactions of dynein light chain LC8. *Journal of molecular biology*, 384(4):954–66, 2008.

- [146] Christine M Lightcap, Shangjin Sun, James D Lear, Ulrich Rodeck, Tatyana Polenova, y John C Williams. Biochemical and structural characterization of the Pak1-LC8 interaction. *The Journal of biological chemistry*, 283(40):27314–24, 2008.
- [147] Péter Rapali, László Radnai, Dániel Süveges, Veronika Harmat, Ferenc Tölgyesi, Weixiao Y Wahlgren, Gergely Katona, László Nyitray, y Gábor Pál. Directed evolution reveals the binding motif preference of the LC8/DYNLL hub protein and predicts large numbers of novel binders in the human proteome. *PloS one*, 6(4):e18818, 2011.
- [148] Pablo Gallego, Adrian Velazquez-Campoy, Laura Regué, Joan Roig, y David Reverter. Structural analysis of the regulation of the DYNLL/LC8 binding to Nek9 by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 288(17):12283–94, 2013.
- [149] Lauren K Slevin, Erin M Romes, Mary G Dandulakis, y Kevin C Slep. The Mechanism of Dynein Light Chain LC8-mediated Oligomerization of the Ana2 Centriole Duplication Factor. *The Journal of biological chemistry*, 289(30):20727–39, 2014.
- [150] Andrea Bodor, László Radnai, Csaba Hetényi, Peter Rapali, András Láng, Katalin E Kövér, András Perczel, Weixiao Yuan Wahlgren, Gergely Katona, y László Nyitray. DYNLL2 dynein light chain binds to an extended linear motif of myosin 5a tail that has structural plasticity. *Biochemistry*, 2014.
- [151] Angela M Gronenborn. Domain Swapping. In Gordon C. K. Roberts, editor, *Encyclopedia of Biophysics*, chapter D, pages 498–503. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [152] Michael P. Schlunegger, Melanie J. Bennett, y David Eisenberg. Oligomer Formation By 3D Domain Swapping: A Model For Protein Assembly And Misassembly. In *Advances in Protein Chemistry Volume 50*, volume 50 of *Advances in Protein Chemistry*, pages 61–122. Elsevier, 1997.
- [153] J Kyte y R F Doolittle. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, 157(1):105–132, 1982.
- [154] Jing Song Fan, Qiang Zhang, Hidehito Tochio, y Mingjie Zhang. Backbone dynamics of the 8 kDa dynein light chain dimer reveals molecular basis of the protein’s functional diversity. *Journal of Biomolecular NMR*, 23(2):103–114, 2002.
- [155] Ignacio Rodríguez-Agüez-Crespo, Belén Yélamos, Fernando Roncal, Juan Pablo Albar, Paul R. Ortiz de Montellano, y Francisco Gavilanes. Identification of novel cellular proteins that bind to the LC8 dynein light chain using a pepscan technique. *FEBS Letters*, 503(2-3):135–141, 2001.
- [156] K W Lo, S Naisbitt, J S Fan, Morgan Sheng, y Mingjie Zhang. The 8-kDa dynein light chain binds to its targets via a conserved (K/R)XTQT motif. *The Journal of biological chemistry*, 276(17):14059–66, 2001.
- [157] Stephen M. King, Elisa Barbarese, James F. Dillman, Ramila S. Patel-King, John H. Carson, y K. Kevin Pfister. Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000 light chain. *The Journal of biological chemistry*, 271(32):19358–66, 1996.

- [158] Lei Wang, Michael Hare, Thomas S. Hays, y Elisar Barbar. Dynein Light Chain LC8 Promotes Assembly of the Coiled-Coil Domain of Swallow Protein. *Biochemistry*, 43(15):4611–4620, 2004.
- [159] Yuyeon Jung, Hojin Kim, Sun Hee Min, Sue Goo Rhee, y Woojin Jeong. Dynein light chain LC8 negatively regulates NF-kappaB through the redox-dependent interaction with IkappaBalpha. *The Journal of biological chemistry*, 283(35):23863–23871, 2008.
- [160] E V Koonin y L Aravind. Dynein light chains of the Roadblock/LC7 group belong to an ancient protein superfamily implicated in NTPase regulation. *Current biology : CB*, 10(21):R774–6, 2000.
- [161] Y K Mok, K W Lo, y Mingjie Zhang. Structure of Tctex-1 and its interaction with cytoplasmic dynein intermediate chain. *The Journal of biological chemistry*, 276(17):14067–74, 2001.
- [162] Stephen J. Susalka, Karina Nikulina, Mark W. Salata, Patricia S. Vaughan, Stephen M. King, Kevin T. Vaughan, y K. Kevin Pfister. The roadblock light chain binds a novel region of the cytoplasmic Dynein intermediate chain. *The Journal of biological chemistry*, 277(36):32939–46, 2002.
- [163] A. B. Bowman. Drosophila roadblock and Chlamydomonas LC7: A Conserved Family of Dynein-associated Proteins Involved in Axonal Transport, Flagellar Motility, and Mitosis. *The Journal of Cell Biology*, 146(1):165–180, 1999.
- [164] Qunyan Jin, Guofeng Gao, y Kathleen M Mulder. Requirement of a dynein light chain in TGFbeta-Smad3 signaling. *Journal of cellular physiology*, 221(3):707–15, 2009.
- [165] Balasubramaniam Ashokkumar, Svetlana M Nabokina, Thomas Y Ma, y Hamid M Said. Identification of dynein light chain road block-1 as a novel interaction partner with the human reduced folate carrier. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 297(3):G480–7, 2009.
- [166] Bas Wanschers, Rinske van de Vorstenbosch, Mietske Wijers, Bé Wieringa, Stephen M King, y Jack Fransen. Rab6 family proteins interact with the dynein light chain protein DYNLRB1. *Cell motility and the cytoskeleton*, 65(3):183–96, 2008.
- [167] Jikui Song, Robert C Tyler, Min S Lee, Ejan M Tyler, y John L Markley. Solution structure of isoform 1 of Roadblock/LC7, a light chain in the dynein complex. *Journal of molecular biology*, 354(5):1043–51, 2005.
- [168] Udayar Ilangovan, Wei Ding, Yan Zhong, Christina L Wilson, Jay C Groppe, James T Trbovich, Jorge Zúñiga, Borries Demeler, Qian Tang, Guofeng Gao, Kathleen M Mulder, y Andrew P Hinck. Structure and dynamics of the homodimeric dynein light chain km23. *Journal of molecular biology*, 352(2):338–54, 2005.
- [169] Jun-Feng Liu, Zhan-Xin Wang, Xin-Quan Wang, Qun Tang, Xiao-Min An, Lu-Lu Gui, y Dong-Cai Liang. Crystal structure of human dynein light chain Dnlc2A: structural insights into the interaction with IC74. *Biochemical and biophysical research communications*, 349(3):1125–9, 2006.

- [170] Afua Nyarko y Elisar Barbar. Light chain-dependent self-association of dynein intermediate chain. *The Journal of biological chemistry*, 286(2):1556–66, 2011.
- [171] Justin Daniel Hall, Yajuan Song, P Andrew Karplus, y Elisar Barbar. The crystal structure of dynein intermediate chain-light chain roadblock complex gives new insights into dynein assembly. *The Journal of biological chemistry*, 285(29):22566–75, 2010.
- [172] Qunyan Jin. A Dynein Motor Attachment Complex Regulates TGF $\beta$ /Smad3 Signaling. *International Journal of Biological Sciences*, 9(6):531–540, 2013.
- [173] E Lader, H S Ha, M O’Neill, K Artzt, y D Bennett. Tctex-1: a Candidate Gene Family for a Mouse T Complex Sterility Locus. *Cell*, 58(5):969–79, 1989.
- [174] S M King, J F Dillman, Sharon E Benashski, R J Lye, R S Patel-King, y K Kevin Pfister. The Mouse t-Complex-encoded Protein Tctex-1 Is a Light Chain of Brain Cytoplasmic Dynein. *Journal of Biological Chemistry*, 271(50):32281–32287, 1996.
- [175] Alistair Harrison, Patricia Olds-Clarke, y Stephen M. King. Identification of the t Complex-encoded Cytoplasmic Dynein Light Chain Tctex1 in Inner Arm II Supports the Involvement of Flagellar Dyneins in Meiotic Drive. *The Journal of Cell Biology*, 140(5):1137–1148, 1998.
- [176] Anne-Francolse Roux, Johanna Rommens, Cathy McDowell, Lynn Anson-Cartwright, Sherllyn Bell, Keith Schappert, Gerry A. Flshman, y Maria Musarella. Identification of a gene from Xp21 with similarity to the tctex-1 gene of the murine t complex. *Human Molecular Genetics*, 3(2):257–263, 1994.
- [177] Stephen M. King, E. Barbarese, J. F. Dillman, Sharon E. Benashski, K T Do, R S Patel-King, y K K Pfister. Cytoplasmic dynein contains a family of differentially expressed light chains. *Biochemistry*, 37(43):15033–41, 1998.
- [178] Linda M DiBella, Sharon E Benashski, Hugo W Tedford, Alistair Harrison, Ramila S Patel-King, y Stephen M King. The Tctex1/Tctex2 class of dynein light chains. Dimerization, differential expression, and interaction with the LC8 protein family. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17):14366–14373, 2001.
- [179] Ramila S Patel-King, Sharon E Benashski, Alistair Harrison, y Stephen M King. A Chlamydomonas Homologue of the Putative Murine t Complex Distorter Tctex-2 Is an Outer Arm Dynein Light Chain. *The Journal of cell biology*, 137(5):1081–1090, 1997.
- [180] Qingjun Meng, Andreas Lux, Andreas Holloschi, Jian Li, John M X Hughes, Tassilo Foerg, John E G McCarthy, Anthony M Heagerty, Petra Kioschis, Mathias Hafner, y John M Garland. Identification of Tctex2beta, a novel dynein light chain family member that interacts with different transforming growth factor-beta receptors. *The Journal of biological chemistry*, 281(48):37069–80, 2006.
- [181] C. Caggese, R. Moschetti, G. Ragone, P. Barsanti, y R. Caizzi. dtctex-1, the Drosophila melanogaster homolog of a putative murine t-complex distorter encoding a dynein light chain, is required for production of functional sperm. *Molecular Genetics and Genomics*, 265(3):436–444, 2001.



- [182] Min-gang Li, Madeline Serr, Eric A. Newman, y Thomas S. Hays. The *Drosophila* tctex-1 light chain is dispensable for essential cytoplasmic dynein functions but is required during spermatid differentiation. *Molecular biology of the*, 15(July):3005–3014, 2004.
- [183] Jen-Zen Chuang, Teresa A. Milner, y Ching-Hwa Sung. Subunit heterogeneity of cytoplasmic dynein: Differential expression of 14 kDa dynein light chains in rat hippocampus. *The Journal of neuroscience*, 21(15):5501–12, 2001.
- [184] Kui Li, Qi Zhang, Jennifer L. Johnson, y Gustavo D. Aguirre. Comparative analysis, gene organization and expression of canine TCTE1L. *Gene*, 303(1-2):207–212, 2003.
- [185] John C Williams, Hui Xie, y Wayne a Hendrickson. Crystal structure of dynein light chain TcTex-1. *The Journal of biological chemistry*, 280(23):21981–6, 2005.
- [186] M a S Toledo, M T P Favaro, R F Alves, C a Santos, L L Beloti, a Crucello, a S Santiago, J S Mendes, M a C Horta, R Aparicio, a P Souza, y a R Azzoni. Characterization of the human dynein light chain Rp3 and its use as a non-viral gene delivery vector. *Applied microbiology and biotechnology*, 2013.
- [187] Matthew Talbott, Michael Hare, Afua Nyarko, Thomas S. T.S. Hays, y Elisar Barbar. Folding is coupled to dimerization of Tctex-1 dynein light chain. *Biochemistry*, 45(22):6793–800, 2006.
- [188] Hongwei Wu, Mark W Maciejewski, Sachiko Takebe, y Stephen M King. Solution structure of the Tctex1 dimer reveals a mechanism for dynein-cargo interactions. *Structure*, 13(2):213–23, 2005.
- [189] Justin Daniel Hall, P. Andrew Karplus, y Elisar Barbar. Multivalency in the assembly of intrinsically disordered Dynein intermediate chain. *The Journal of biological chemistry*, 284(48):33115–21, 2009.
- [190] Narayanan Eswar, Ben Webb, Marc a Marti-Renom, M S Madhusudhan, David Eramian, Min-Yi Shen, Ursula Pieper, y Andrej Sali. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]*, Chapter 2:Unit 2.9, 2007.
- [191] Nobuyuki Kai, Masayoshi Mishina, y Takeshi Yagi. Molecular cloning of Fyn-Associated molecules in the mouse central nervous system. *Journal of Neuroscience Research*, 48(5):407–424, 1997.
- [192] Kerry S Campbell, Suzanne Cooper, Mark Dessing, Sol Yates, y Annie Buder. Interaction of p59fyn kinase with the dynein light chain, Tctex-1, and colocalization during cytokinesis. *Journal of immunology*, 161(4):1728–1737, 1998.
- [193] Tao Mou, Jonathan R. Kraas, Eric T. Fung, y Sheridan L. Swope. Identification of a dynein molecular motor component in Torpedo electroplax ; binding and phosphorylation of Tctex-1 by Fyn. *FEBS Letters*, 435:275–281, 1998.
- [194] a Bauch, K S Campbell, y M Reth. Interaction of the CD5 cytoplasmic domain with the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase IIdelta. *European journal of immunology*, 28(7):2167–77, 1998.

- [195] Fumiko Nagano, Satoshi Orita, Takuya Sasaki, Akira Naito, Gaku Sakaguchi, Miki Maeda, Tsuyoshi Watanabe, Eiki Kominami, Yasuo Uchiyama, y Yoshimi Takai. Interaction of Doc2 with tctex-1, a Light Chain of Cytoplasmic. *The Journal of biological chemistry*, 273(46):30065–30068, 1998.
- [196] Andrew W Tai, Jen-zen Chuang, Christian Bode, Uwe Wolfrum, y Ching-hwa Sung. Rhodopsin's Carboxy-Terminal Cytoplasmic Tail Acts as a Membrane Receptor for Cytoplasmic Dynein by Binding to the Dynein Light Chain Tctex-1. *Cell*, 97:877–887, 1999.
- [197] Sophie A Lukashok, Leonid Tarassishin, Yongan Li, y Marshall S Horwitz. An adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis complexes with dynein and a small GTPase. *Journal of virology*, 74(10):4705–9, 2000.
- [198] H Yano, F S Lee, H Kong, J Chuang, J Arevalo, P Perez, Ching-Hwa Sung, y M V Chao. Association of Trk neurotrophin receptors with components of the cytoplasmic dynein motor. *The Journal of neurosciencem*, 21(3):RC125, 2001.
- [199] Steffen Mueller, Xuemei Cao, Reinhold Welker, y Eckard Wimmer. Interaction of the poliovirus receptor CD155 with the dynein light chain Tctex-1 and its implication for poliovirus pathogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 277(10):7897–904, 2002.
- [200] Seii Ohka, Norie Matsuda, Koujiro Tohyama, Toshiyuki Oda, Masato Morikawa, Shusuke Kuge, y Akio Nomoto. Receptor (CD155)-Dependent Endocytosis of Poliovirus and Retrograde Axonal Transport of the Endosome. *Journal of Virology*, 78(13):7186–7198, 2004.
- [201] Daita Nadano, Jun Nakayama, Shu-ichi Matsuzawa, Taka-aki Sator, Tsukasa Matsuda, y Michiko N. Fukuda. Human tastin, a proline-rich cytoplasmic protein, associates with the microtubular cytoskeleton. *Biochemical Journal*, 364:669–677, 2002.
- [202] Christian Schwarzer, Shitsu Barnikol-Watanabe, Friedrich P Thinner, y Norbert Hilschmann. Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(9):1059–70, 2002.
- [203] Ya-dong Fang, Xue Xu, Yong-ming Dang, Yi-ming Zhang, Jia-ping Zhang, Jiong-yu Hu, Qiong Zhang, Xia Dai, Miao Teng, Dong-xia Zhang, y Yue-sheng Huang. MAP4 Mechanism that Stabilizes Mitochondrial Permeability Transition in Hypoxia: Microtubule Enhancement and DYNLT1 Interaction with VDAC1. *PLoS ONE*, 6(12):e28052, 2011.
- [204] Rajiv D Machado, Nung Rudarakanchana, Carl Atkinson, Julia a Flanagan, Rachel Harrison, Nicholas W Morrell, y Richard C Trembath. Functional interaction between BMPR-II and Tctex-1, a light chain of Dynein, is isoform-specific and disrupted by mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Human molecular genetics*, 12(24):3277–86, 2003.
- [205] Misbah Malik-Hall, W. Y Louisa Poon, Mark D. Baker, John N. Wood, y Kenji Okuse. Sensory neuron proteins interact with the intracellular domains of sodium channel NaV1.8. *Molecular Brain Research*, 110(2):298–304, 2003.

- [206] Maki Sugai, Masaki Saito, Izumi Sukegawa, Yuriko Katsushima, Yoshitaka Kinouchi, Norimichi Nakahata, Tooru Shimosegawa, Teruyuki Yanagisawa, y Jun Sukegawa. PTH/PTH-related protein receptor interacts directly with Tctex-1 through its COOH terminus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(1):24–31, 2003.
- [207] L Giot, J S Bader, C Brouwer, A Chaudhuri, B Kuang, Y Li, Y L Hao, C E Ooi, B Godwin, E Vitols, G Vijayadamodar, P Pochart, H Machineni, M Welsh, Y Kong, B Zerhusen, R Malcolm, Z Varrone, A Collis, M Minto, S Burgess, L McDaniel, E Stimpson, F Spriggs, J Williams, K Neurath, N Ioime, M Agee, E Voss, K Furtak, R Renzulli, N Aanensen, S Carrolla, E Bickelhaupt, Y Lazovatsky, A DaSilva, J Zhong, C A Stanyon, R L Finley, K P White, M Braverman, T Jarvie, S Gold, M Leach, J Knight, R A Shimkets, M P McKenna, J Chant, y J M Rothberg. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5651):1727–1736, 2003.
- [208] Nicole J W De Wit, Pauline Verschuure, Guido Kappé, Stephen M King, Wilfried W De Jong, Goos N P van Muijen, y Wilbert C Boelens. Testis-specific human small heat shock protein HSPB9 is a cancer/testis antigen, and potentially interacts with the dynein subunit TCTEL1. *European journal of cell biology*, 83(7):337–45, 2004.
- [209] Meizan Lai, Fushun Wang, Joyce G Rohan, Yuka Maeno-Hikichi, Yuan Chen, Yi Zhou, Guangping Gao, William a Sather, y Ji-fang Zhang. A tctex1-Ca<sup>2+</sup> channel complex for selective surface expression of Ca<sup>2+</sup> channels in neurons. *Nature neuroscience*, 8(4):435–442, 2005.
- [210] Norio Takizawa, Tara C Smith, Thomas Nebl, Jessica L Crowley, Stephen J Palmieri, Lawrence M Lifshitz, Anka G Ehrhardt, Laura M Hoffman, Mary C Beckerle, y Elizabeth J Luna. Supravillin modulation of focal adhesions involving TRIP6/ZRP-1. *The Journal of cell biology*, 174(3):447–58, 2006.
- [211] Pallavi Sachdev, Santosh Menon, David B Kastner, Jen-Zen Chuang, Ting-Yu Yeh, Cecilia Conde, Alfredo Caceres, Ching-Hwa Sung, y Thomas P. Sakmar. G protein beta gamma subunit interaction with the dynein light-chain component Tctex-1 regulates neurite outgrowth. *The EMBO journal*, 26(11):2621–32, 2007.
- [212] Jirí Vlach, Jan Lipov, Michaela Rumlová, Václav Veverka, Jan Lang, Pavel Srb, Zdenek Knejzlík, Iva Pichová, Eric Hunter, Richard Hrabal, y Tomás Ruml. D-retrovirus morphogenetic switch driven by the targeting signal accessibility to Tctex-1 of dynein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30):10565–70, 2008.
- [213] Andrée Gauthier-Fisher, Dan C Lin, Melissa Greeve, David R Kaplan, Robert Rottapel, y Freda D Miller. Lfc and Tctex-1 regulate the genesis of neurons from cortical precursor cells. *Nature neuroscience*, 12(6):735–44, 2009.
- [214] David Meiri, Christopher B. Marshall, Melissa A. Greeve, Bryan Kim, Marc Balan, Fernando Suarez, Chuanjin Wu, Jose LaRose, Noah Fine, Mitsuhiro Ikura, y Robert Rottapel. Mechanistic Insight into the Microtubule and Actin Cytoskeleton Coupling through Dynein-Dependent RhoGEF Inhibition. *Molecular Cell*, 45(5):642–655, 2012.

- [215] Cecilia Conde, Cristina Arias, Maria Robin, Aiqun Li, Masaki Saito, Jen-Zen Chuang, Angus C Nairn, Ching-Hwa Sung, y Alfredo Cáceres. Evidence for the involvement of Lfc and Tctex-1 in axon formation. *The Journal of neuroscience*, 30(19):6793–800, 2010.
- [216] Nathan J Pavlos, Tak Sum Cheng, An Qin, Pei Ying Ng, Hao-Tian Feng, Estabelle S M Ang, Amerigo Carrello, Ching-Hwa Sung, Reinhard Jahn, Ming-Hao Zheng, y Jiake Xu. Tctex-1, a novel interaction partner of Rab3D, is required for osteoclastic bone resorption. *Molecular and cellular biology*, 31(7):1551–64, 2011.
- [217] Jean-Baptiste Brault, Mateusz Kudelko, Pierre-Olivier Vidalain, Frédéric Tangy, Philippe Desprès, y Nathalie Pardigon. The interaction of flavivirus M protein with light chain Tctex-1 of human dynein plays a role in late stages of virus replication. *Virology*, 417(2):369–378, 2011.
- [218] David Duguay, Erika Bélanger-Nelson, Valérie Mongrain, Anna Beben, Armen Khatchadourian, y Nicolas Cermakian. Dynein light chain Tctex-type 1 modulates orexin signaling through its interaction with orexin 1 receptor. *PloS one*, 6(10):e26430, 2011.
- [219] Kazuhiko Ochiai, Masami Watanabe, Hideo Ueki, Peng Huang, Yasuyuki Fujii, Yasutomo Nasu, Hirofumi Noguchi, Takeshi Hirata, Masakiyo Sakaguchi, Nam-Ho Huh, Yuji Kashiwakura, Haruki Kaku, y Hiromi Kumon. Tumor suppressor REIC/Dkk-3 interacts with the dynein light chain, Tctex-1. *Biochemical and biophysical research communications*, 412(2):391–5, 2011.
- [220] Luise Florin, Katrin A. Becker, Carsten Lambert, Thorsten Nowak, Cornelia Sapp, Dennis Strand, Rolf E. Streeck, y Martin Sapp. Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein l2. *Journal of virology*, 80(13):6691–6, 2006.
- [221] Marc a Schneider, Gilles a Spoden, Luise Florin, y Carsten Lambert. Identification of the dynein light chains required for human papillomavirus infection. *Cellular microbiology*, 13(1):32–46, 2011.
- [222] Nayan J. Sarma y Nabeel R. Yaseen. Dynein Light Chain 1 (DYNLT1) Interacts with Normal and Oncogenic Nucleoporins. *PLoS ONE*, 8(6):e67032, 2013.
- [223] Jeffrey Mital, Erika I. Lutter, Alexandra C. Barger, Cheryl a. Dooley, y Ted Hackstadt. Chlamydia trachomatis inclusion membrane protein CT850 interacts with the dynein light chain DYNLT1 (Tctex1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1(May):1–6, 2015.
- [224] Mark W Douglas, Russell J Diefenbach, Fred L Homa, Monica Miranda-Saksena, Frazer J Rixon, Valerio Vittone, Karen Byth, y Anthony L Cunningham. Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. *The Journal of biological chemistry*, 279(27):28522–30, 2004.
- [225] Arin Apcarian, Anthony L Cunningham, y Russell J Diefenbach. Identification of binding domains in the herpes simplex virus type 1 small capsid protein pUL35 (VP26). *The Journal of general virology*, 91 (Pt 11):2659–63, 2010.

- [226] Ting-Yu Yeh, Jen-Zen Chuang, y Ching-Hwa Sung. Dynein light chain rp3 acts as a nuclear matrix-associated transcriptional modulator in a dynein-independent pathway. *Journal of cell science*, 118(Pt 15):3431–43, 2005.
- [227] D. Asante, N. L. Stevenson, y D. J. Stephens. Subunit composition of the human cytoplasmic dynein-2 complex. *Journal of Cell Science*, 127(21):4774–4787, 2014.
- [228] Chenshu Liu, Jen-Zen Chuang, Ching-Hwa Sung, y Yinghui Mao. A dynein independent role of Tctex-1 at the kinetochore. *Cell Cycle*, 14(9):1379–1388, 2015.
- [229] Jie-rong Huang, Timothy D Craggs, John Christodoulou, y Sophie E Jackson. Stable intermediate states and high energy barriers in the unfolding of GFP. *Journal of molecular biology*, 370(2):356–71, 2007.
- [230] X. Huang, H.-L. Wang, S.-T. Qi, Z.-B. Wang, J.-S. Tong, Q.-H. Zhang, Y.-C. Ouyang, Y. Hou, H. Schatten, Z.-Q. Qi, y Q.-Y. Sun. DYNLT3 Is Required for Chromosome Alignment During Mouse Oocyte Meiotic Maturation. *Reproductive Sciences*, 18(10):983–989, 2011.
- [231] Ting-Yu Yeh, Diego Peretti, Jen-Zen Chuang, Enrique Rodriguez-Boulan, y Ching-Hwa Sung. Regulatory dissociation of Tctex-1 light chain from dynein complex is essential for the apical delivery of rhodopsin. *Traffic*, 7(11):1495–502, 2006.
- [232] Carlos Dedesma, Jen-zen Chuang, y Peter D Alfinito. Dynein Light Chain Tctex-1 Identifies Neural Progenitors in Adult Brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 786(August 2005):773–786, 2006.
- [233] David Meiri, Christopher B. Marshall, Daphna Mokady, Jose LaRose, Michael Mullin, Anne-Claude Gingras, Mitsuhiko Ikura, y Robert Rottapel. Mechanistic insight into GPCR-mediated activation of the microtubule-associated RhoA exchange factor GEF-H1. *Nature Communications*, 5:4857, 2014.
- [234] Aiqun Li, Masaki Saito, Jen-Zen Chuang, Yun-Yu Tseng, Carlos Dedesma, Kazuhito Tomizawa, Taku Kaitsuka, y Ching-Hwa Sung. Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. *Nature cell biology*, 13(4):402–11, 2011.
- [235] Jen-Zen Chuang, Ting-Yu Yeh, Flavia Bollati, Cecilia Conde, Federico Canavosio, Alfredo Caceres, y Ching-Hwa Sung. The dynein light chain Tctex-1 has a dynein-independent role in actin remodeling during neurite outgrowth. *Developmental cell*, 9(1):75–86, 2005.
- [236] Yajuan Song, Gregory Benison, Afua Nyarko, Thomas S Hays, y Elisar Barbar. Potential role for phosphorylation in differential regulation of the assembly of dynein light chains. *The Journal of biological chemistry*, 282(23):17272–9, 2007.
- [237] Huirong Yang, Rui Gong, y Yanhui Xu. Control of cell growth: Rag GTPases in activation of TORC1. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2012.
- [238] a L Millar, N J Pavios, J Xu, y M H Zheng. Rab3D: a regulator of exocytosis in non-neuronal cells. *Histology and histopathology*, 17(3):929–36, 2002.

- [239] Christophe Guilluy, Rafael Garcia-Mata, y Keith Burridge. Rho protein crosstalk: another social network? *Trends in cell biology*, 21(12):718–26, 2011.
- [240] Clara Aicart-Ramos, Lucía Sánchez-Ruiloba, Mónica Gómez-Parrizas, Carlos Zaragoza, Teresa Iglesias, y Ignacio Rodríguez-Crespo. Protein kinase D activity controls endothelial nitric oxide synthesis. *Journal of cell science*, 127(Pt 15):3360–72, 2014.
- [241] S H Snyder y D S Bredt. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends in pharmacological sciences*, 12: 125–128, 1991.
- [242] Mónica Martínez-Moreno, Inmaculada Navarro-Lérida, Fernando Roncal, Juan Pablo Albar, Covadonga Alonso, Francisco Gavilanes, y Ignacio Rodríguez-Crespo. Recognition of novel viral sequences that associate with the dynein light chain LC8 identified through a pepscan technique. *FEBS Letters*, 544(1-3):262–267, 2003.
- [243] Inmaculada Navarro-Lérida, Mónica Martínez Moreno, Fernando Roncal, Francisco Gavilanes, Juan Pablo Albar, y Ignacio Rodríguez-Crespo. Proteomic identification of brain proteins that interact with dynein light chain LC8. *Proteomics*, 4(2):339–46, 2004.
- [244] María F García-Mayoral, Mónica Martínez-Moreno, Juan P Albar, Ignacio Rodríguez-Crespo, y Marta Bruix. Structural basis for the interaction between dynein light chain 1 and the glutamate channel homolog GRINL1A. *The FEBS journal*, 277(10):2340–50, 2010.
- [245] Péter Rapali, María Flor García-Mayoral, Mónica Martínez-Moreno, Krisztián Tárnok, Katalin Schlett, Juan Pablo Albar, Marta Bruix, László Nyitray, y Ignacio Rodríguez-Crespo. LC8 dynein light chain (DYNLL1) binds to the C-terminal domain of ATM-interacting protein (ATMIN/ASCIZ) and regulates its subcellular localization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(3):493–498, 2011.
- [246] Covadonga Alonso, James Miskin, Bruno Hernáez, Patricia Fernandez-Zapatero, Lourdes Soto, Carmen Canto, Ignacio Rodríguez-Crespo, Linda Dixon, y José M Escribano. African Swine Fever Virus Protein p54 Interacts with the Microtubular Motor Complex through Direct Binding to Light-Chain Dynein. *Journal of Virology*, 75(20):9819–9827, 2001.
- [247] Bruno Hernáez, Gema Díaz-Gil, Mónica García-Gallo, José Ignacio Quetglas, Ignacio Rodríguez-Crespo, Linda Dixon, José M Escribano, y Covadonga Alonso. The African swine fever virus dynein-binding protein p54 induces infected cell apoptosis. *FEBS letters*, 569(1-3):224–8, 2004.
- [248] María Flor García-Mayoral, Ignacio Rodríguez-Crespo, y Marta Bruix. Structural models of DYNLL1 with interacting partners: African swine fever virus protein p54 and postsynaptic scaffolding protein gephyrin. *FEBS letters*, 585(1):53–7, 2011.
- [249] Simon Erlendsson, Mette Rathje, Pétur O Heidarsson, Flemming M Poulsen, Kenneth L Madsen, Kaare Teilum, y Ulrik Gether. Protein interacting with C-kinase 1 (PICK1) binding promiscuity relies on unconventional PSD-95/discs-large/ZO-1 homology (PDZ) binding modes for nonclass II PDZ ligands. *The Journal of biological chemistry*, 289(36):25327–40, 2014.

- [250] Pravat K. Mandal. Complete NMR Spectroscopic Assignment of a Neuronal Transduction Protein. *Monatshefte fur Chemie*, 133:205–217, 2002.
- [251] Jiunn R Chen, Bryan H Chang, John E Allen, Michael A Stiffler, y Gavin MacBeath. Predicting PDZ domain-peptide interactions from primary sequences. *Nature biotechnology*, 26(9):1041–5, 2008.
- [252] Andreas Ernst, Brent A. Appleton, Ylva Ivarsson, Yingnan Zhang, David Gfeller, Christian Wiesmann, y Sachdev S. Sidhu. A structural portrait of the PDZ domain family. *Journal of molecular biology*, 426(21):3509–19, 2014.
- [253] N. J. Skelton. Origins of PDZ Domain Ligand Specificity. STRUCTURE DETERMINATION AND MUTAGENESIS OF THE ERBIN PDZ DOMAIN. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9):7645–7654, 2002.
- [254] Yuqi Liu, Gillian D. Henry, Rashmi S. Hegde, y James D. Baleja. Solution Structure of the hDlg/SAP97 PDZ2 Domain and Its Mechanism of Interaction with HPV-18 Papillomavirus E6 Protein. *Biochemistry*, 46(38):10864–10874, 2007.
- [255] Johan Schultz, Ulrich Hoffmuüller, Gerd Krause, Jennifer Ashurst, Maria J. Macias, Peter Schmieder, Jens Schneider-Mergener, y Hartmut Oschkinat. Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. *Nature Structural Biology*, 5(1):19–24, 1998.
- [256] Ana Maria Rojas, Gloria Fuentes, Antonio Rausell, y Alfonso Valencia. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *The Journal of cell biology*, 196(2):189–201, 2012.
- [257] Rein Aasland, Charles Abrams, Christophe Ampe, Linda J. Ball, Mark T. Bedford, Gianni Cesareni, Mario Gimona, James H. Hurley, Thomas Jarchau, Veli Pekka Lehto, Mark a. Lemmon, Rune Linding, Bruce J. Mayer, Makoto Nagai, Marius Sudol, Ulrich Walter, y Steve J. Winder. Normalization of nomenclature for peptide motifs as ligands of modular protein domains. *FEBS Letters*, 513(1):141–144, 2002.
- [258] N Nakashima, E Noguchi, y T Nishimoto. *Saccharomyces cerevisiae* putative G protein, Gtr1p, which forms complexes with itself and a novel protein designated as Gtr2p, negatively regulates the Ran/Gsp1p G protein cycle through Gtr2p. *Genetics*, 152(3):853–67, 1999.
- [259] John Colicelli. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2004(250):RE13, 2004.
- [260] Krister Wennerberg, Kent L Rossman, y Channing J Der. The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science*, 118(Pt 5):843–6, 2005.
- [261] Baruch Z. Harris, Brian J. Hillier, y Wendell A. Lim. Energetic determinants of internal motif recognition by PDZ domains. *Biochemistry*, 40(20):5921–30, 2001.
- [262] Norma J Greenfield. Circular dichroism analysis for protein-protein interactions. *Methods for Molecular Biology*, 261:55–77, 2004.

- [263] Todd J Dolinsky, Jens E Nielsen, J Andrew McCammon, y Nathan A Baker. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic acids research*, 32(Web Server issue):W665–7, 2004.
- [264] N A Baker, D Sept, S Joseph, M J Holst, y J a McCammon. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18):10037–41, 2001.
- [265] K. S. Christopherson, B. J. Hillier, W. A. Lim, y D. S. Bredt. PSD-95 Assembles a Ternary Complex with the N-Methyl-D-aspartic Acid Receptor and a Bivalent Neuronal NO Synthase PDZ Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 274(39):27467–27473, 1999.
- [266] R. Sattler. Specific Coupling of NMDA Receptor Activation to Nitric Oxide Neurotoxicity by PSD-95 Protein. *Science*, 284(5421):1845–1848, 1999.
- [267] V L Dawson, T M Dawson, E D London, D S Bredt, y S H Snyder. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(14):6368–71, 1991.
- [268] Kuan-Cheng Chang, Andreas S. Barth, Tetsuo Sasano, Eddy Kizana, Yuji Kashiwakura, Yiqiang Zhang, D. Brian Foster, y Eduardo Marbán. CAPON modulates cardiac repolarization via neuronal nitric oxide synthase signaling in the heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(11):4477–82, 2008.
- [269] Li-Li Li, Vanessa Ginot, Xiaonan Liu, Olga Vergun, Minna Tuittila, Marc Mathieu, Christophe Bonny, Julien Puyal, Anita C Truttmann, y Michael J Courtney. The nNOS-p38MAPK pathway is mediated by NOS1AP during neuronal death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(19):8185–201, 2013.
- [270] Michael J. Courtney, Li-Li Li, y Yvonne Y. Lai. Mechanisms of NOS1AP action on NMDA receptor-nNOS signaling. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8(August):252, 2014.
- [271] Li-Li Li, Raquel M. Melero-Fernandez de Mera, Jia Chen, Wei Ba, Nael Nadif Kasri, Mingjie Zhang, y Michael J. Courtney. Unexpected Heterodivalent Recruitment of NOS1AP to nNOS Reveals Multiple Sites for Pharmacological Intervention in Neuronal Disease Models. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(19):7349–64, 2015.
- [272] Sudhir C. Sharma, Chamila N. Rupasinghe, Rachel B. Parisien, y Mark R. Spaller. Design, synthesis, and evaluation of linear and cyclic peptide ligands for PDZ10 of the multi-PDZ domain protein MUPP1. *Biochemistry*, 46(44):12709–20, 2007.
- [273] Sjoerd J de Vries, Marc van Dijk, y Alexandre M J J Bonvin. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nature protocols*, 5(5):883–97, 2010.



- [274] Cyril Dominguez, Rolf Boelens, y Alexandre M J J Bonvin. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*, 125(7):1731–7, 2003.
- [275] Sjoerd J de Vries, Aalt D J van Dijk, Mickaël Krzeminski, Mark van Dijk, Aurelien Thureau, Victor Hsu, Tsjerck Wassenaar, y Alexandre M J J Bonvin. HADDOCK versus HADDOCK: new features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. *Proteins*, 69(4):726–33, 2007.
- [276] Rui Ding, Yizhao Chen, Shuo Yang, Xinqing Deng, Zhenghao Fu, Liang Feng, Yingqian Cai, Mouxuan Du, Yuxi Zhou, y Yanping Tang. Blood-brain barrier disruption induced by hemoglobin in vivo: Involvement of up-regulation of nitric oxide synthase and peroxynitrite formation. *Brain research*, 1571:1–14, 2014.
- [277] Yan-Ling Zhang y Zhong-Yin Zhang. Low-affinity binding determined by titration calorimetry using a high-affinity coupling ligand: a thermodynamic study of ligand binding to protein tyrosine phosphatase 1B. *Analytical biochemistry*, 261(2):139–148, 1998.
- [278] Péter Rapali, Áron Szenes, László Radnai, Anita Bakos, Gábor Pál, y László Nyitray. DYNLL/LC8: a light chain subunit of the dynein motor complex and beyond. *The FEBS journal*, 278(17):2980–96, 2011.
- [279] Jose a Martina y Rosa Puertollano. Rag GTPases mediate amino acid-dependent recruitment of TFEB and MITF to lysosomes. *The Journal of cell biology*, 200(4):475–91, 2013.
- [280] J.-H. Jeong, K.-H. Lee, Y.-M. Kim, D.-H. Kim, B.-H. Oh, y Y.-G. Kim. Crystal Structure of the Gtr1pGTP-Gtr2pGDP Protein Complex Reveals Large Structural Rearrangements Triggered by GTP-to-GDP Conversion. *Journal of Biological Chemistry*, 287(35):29648–29653, 2012.
- [281] Yasemin Sancak, Timothy R Peterson, Yoav D Shaul, Robert a Lindquist, Carson C Thoreen, Liron Bar-Peled, y David M Sabatini. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5882):1496–501, 2008.
- [282] Iván Angulo, Iván Acebrón, Blanca de las Rivas, Rosario Muñoz, Ignacio Rodríguez-Crespo, Margarita Menéndez, Pedro García, Hiroaki Tateno, Irwin J Goldstein, Begoña Pérez-Agote, y José M Mancheño. High-resolution structural insights on the sugar-recognition and fusion tag properties of a versatile  $\beta$ -trefoil lectin domain from the mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Glycobiology*, 21(10):1349–61, 2011.
- [283] T Sekiguchi, E Hirose, N Nakashima, M Ii, y T Nishimoto. Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(10):7246–57, 2001.
- [284] Daniel G Gibson, Lei Young, Ray-Yuan Chuang, J Craig Venter, Clyde A Hutchison, y Hamilton O Smith. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, 6(5):343–345, 2009.

- [285] Daniel G Gibson, Hamilton O Smith, Clyde A Hutchison, J Craig Venter, y Chuck Merryman. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nature methods*, 7(11):901–903, 2010.
- [286] Johannes Schindelin, Curtis T Rueden, Mark C Hiner, y Kevin W Eliceiri. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development*, in press:DOI: 10.1002/mrd.22489, 2015.
- [287] Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid, Jean-Yves Tinevez, Daniel James White, Volker Hartenstein, Kevin Eliceiri, Pavel Tomancak, y Albert Cardona. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7):676–82, 2012.
- [288] H Ito, Y Fukuda, K Murata, y A. Kimura. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, 153(1):163–168, 1983.
- [289] Chen Katz, Liron Levy-Beladev, Shahar Rotem-Bamberger, Tiago Rito, Stefan G D Rüdiger, y Assaf Friedler. Studying protein-protein interactions using peptide arrays. *Chemical Society reviews*, 40(5): 2131–45, 2011.
- [290] H M Geysen, R H Meloen, y S J Barteling. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(13):3998–4002, 1984.
- [291] D. R. Bundle y B. W. Sigurskjold. Determination of accurate thermodynamics of binding by titration microcalorimetry. *Methods in Enzymology*, 247:288–305, 1994.
- [292] Michael M. Pierce, C. S. Raman, y Barry T. Nall. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods (San Diego, Calif.)*, 19(2):213–21, 1999.
- [293] Sherman Beychok. Circular dichroism of biological macromolecules. *Science (New York, N.Y.)*, 154 (December):1288–1299, 1966.
- [294] Nathan J Moerke. Fluorescence Polarization (FP) Assays for Monitoring Peptide-Protein or Nucleic Acid-Protein Binding. *Current protocols in chemical biology*, 1(1):1–15, 2009.
- [295] LLC Schrödinger. The PyMOL Molecular Graphics System, v1.3r1. 2010.
- [296] H M Berman, J Westbrook, Z Feng, G Gilliland, T N Bhat, H Weissig, I N Shindyalov, y P E Bourne. The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*, 28(1):235–242, 2000.
- [297] Tsjerk A. Wassenaar, Marc van Dijk, Nuno Loureiro-Ferreira, Gijs van der Schot, Sjoerd J. de Vries, Christophe Schmitz, Johan van der Zwan, Rolf Boelens, Andrea Giachetti, Lucio Ferella, Antonio Rosato, Ivano Bertini, Torsten Herrmann, Hendrik R. A. Jonker, Anurag Bagaria, Victor Jaravine, Peter Güntert, Harald Schwalbe, Wim F. Vranken, Jurgen F. Doreleijers, Gert Vriend, Geerten W. Vuister, Daniel Franke, Alexey Kikhney, Dmitri I. Svergun, Rasmus H. Fogh, John Ionides, Ernest D. Laue, Chris Spronk, Simonas Jurkša, Marco Verlato, Simone Badoer, Stefano Dal Pra, Mirco Mazzucato, Eric

- Frizziero, y Alexandre M. J. J. Bonvin. WeNMR: Structural Biology on the Grid. *Journal of Grid Computing*, 10(4):743–767, 2012.
- [298] Fabian Sievers, Andreas Wilm, David Dineen, Toby J Gibson, Kevin Karplus, Weizhong Li, Rodrigo Lopez, Hamish McWilliam, Michael Remmert, Johannes Söding, Julie D Thompson, y Desmond G Higgins. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1):539, 2011.
- [299] Eric Beitz. TeXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LaTeX2e. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 16(2):135–139, 2000.
- [300] T D Schneider y R M Stephens. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic acids research*, 18(20):6097–6100, 1990.